



Comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas Metalaxil e Imazaquín en suelos agrícolas

Memoria que presenta

M.^a del Rocío López Cabeza

para optar al título de Doctora por la
Universidad de Sevilla

Sevilla, abril 2017

Comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas Metalaxil e Imazaquín en suelos agrícolas

Visado en Sevilla, a 5 de abril de 2017

LOS DIRECTORES

Dr. Rafael Celis García
Investigador Científico del CSIC

Dr. Juan Cornejo Suero
Profesor de Investigación del CSIC

EL TUTOR

Dra. María Elena Fernández Boy
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla



FACULTAD DE QUÍMICA
Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

DRA. ROSARIO VAZ PARDAL, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA,
MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas Metalaxil e Imazaquín en suelos agrícolas”, presentada por Dña. M.ª del Rocío López Cabeza para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el marco del Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Medio Ambiente del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola.

En Sevilla, a 5 de abril de 2017



DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas Metalaxil e Imazaquín en suelos agrícolas”, presentada por Dña. M.ª del Rocío López Cabeza para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), bajo la dirección de los Drs. D. Rafael Celis García y D. Juan Cornejo Suero, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 5 de abril de 2017

El presente trabajo se ha realizado en el marco de los Proyectos AGL2011-23779 y AGL2014-51897-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, durante el disfrute de una beca FPI (BES-2012-059945) asociada al primero de los proyectos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la elaboración de esta tesis:

A mis directores, el Dr. Rafael Celis García y el Profesor D. Juan Cornejo Suero, por confiar en mí para realizar esta tesis. Por su dedicación en mi formación investigadora durante estos años y por la supervisión de los trabajos realizados en esta memoria. Soy consciente de que los conocimientos, habilidades y experiencias que han compartido conmigo en estos años tienen un valor inestimable y suponen la piedra angular sobre la que se sustentará mi futuro como investigadora.

A la Dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por las facilidades prestadas.

A la Dra. María Elena Fernández Boy, por ser tutora de este trabajo.

A la Profesora Dña. María del Carmen Hermosín Gaviño por su disponibilidad a lo largo de la realización de esta memoria.

A la Dra. Lucía Cox Meana por el interés mostrado en esta tesis y facilitarme los alperujos estudiados.

A la Dra. Ana Isabel Becerro Nieto y al Dr. Alberto José Fernández Carrión por realizar las medidas de RMN de las muestras de organo-hidrotalcitas de este trabajo y ayudarme en la interpretación de los datos.

Al Dr. Ignacio Girón Moreno, Responsable Técnico de la Finca Experimental la Hampa (IRNAS), por la asistencia técnica en la realización del experimento de campo.

Al Dr. Thomas Poiger y al Dr. Ignaz Buerge, por permitirme realizar una estancia breve en el grupo de Química de Protección de Plantas en el instituto IPS (Institute for Plant Production Sciences) perteneciente a Agroscope (Suiza). Gracias por instruirme en el uso de la técnica de Cromatografía HPLC acoplada a un detector MS-MS, permitirme realizar las medidas contenidas en esta memoria y ayudarme a la interpretación de los resultados. Asimismo, quiero agradecer su hospitalidad y acogida en el laboratorio.

A Bea, por estar siempre disponible cuando lo he necesitado, solventar mis dudas pacientemente y darme consejos en los momentos catastróficos. Ha sido una suerte tenerte como compañera en el laboratorio y como amiga en la vida. Espero que estés satisfecha con el trabajo realizado por tu joven Padawan.

A Pili, por ser la persona que me ha salvaguardado en todo momento. Gracias por prestarme tu ayuda siempre que he tenido algún problema ya fuera en el laboratorio, administrativo o personal. Tu amistad ha dejado en mí una huella indeleble.

A Esperanza, por ayudarme a sobrellevar los agobios y sufrimientos de la vida diaria de un becario predoctoral. Y a Alegría, Anabel y Chari, por sus ánimos. Vuestra amistad y apoyo han hecho más llevaderas y divertidas las intensas jornadas de trabajo.

A María Jesús, por compartir generosamente sus conocimientos sobre Cromatografía y por acompañarme en este arduo camino desde el primer día. A Miguel, gracias por todas las conversaciones mantenidas, de las que he aprendido y disfrutado muchísimo.

A mis compañeras de laboratorio Gracia y Marian por su acogida y ayuda con los experimentos.

A mis compañeros de Química, Rosa, Lola y Alberto, por haber confiado en mis posibilidades antes que yo misma. Y a mis amigos de siempre, Juanmi, Carlos, Emilio, Damarit y Rosa, por estar siempre a mi lado, compartir mis alegrías y ser apoyo en los momentos más duros.

A mis padres, por transmitirme el valor del trabajo y la perseverancia. Gracias por vuestra paciencia infinita, por apoyarme en todas las decisiones tomadas y por no permitirme desistir en ningún momento. A mi hermano y a Sonia, por aconsejarme en cada paso que he dado y alentarme a seguir cuando veía las cosas más oscuras. Y a mi sobrina Cloe, por existir.

Agradezco también al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la concesión de una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador dentro del proyecto nacional AGL2011-23779.

A todas las personas que han pasado por mi vida en estos últimos años y que han colaborado en la elaboración de esta tesis.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Problemática medioambiental de los plaguicidas: importancia de la quiralidad.....	3
1.1.1. Marco internacional y nacional de la problemática del uso de los plaguicidas.....	3
1.1.2. Problemas medioambientales específicos derivados del uso de plaguicidas quirales.....	7
1.2. Dinámica de los plaguicidas en los suelos: enantioselectividad en los procesos de transferencia y transformación.....	12
1.2.1. Procesos de transferencia o transporte.....	13
1.2.1.1. Adsorción-desorción.....	13
1.2.1.2. Lixiviación.....	20
1.2.1.3. Otros procesos de transporte.....	23
1.2.2. Procesos de transformación.....	26
1.2.2.1. Procesos de degradación abiótica.....	26
1.2.2.2. Biodegradación.....	28
1.2.2.3. Enantiomerización.....	30
1.3. Efecto de diversas prácticas agronómicas en el comportamiento de los plaguicidas quirales.....	32
1.3.1. Adición del plaguicida en forma de enantiómero activo puro.....	32
1.3.2. Aplicaciones sucesivas del plaguicida.....	34
1.3.3. Encalado de los suelos.....	36
1.3.4. Aplicación de enmiendas orgánicas.....	39
1.3.4.1. Uso de residuos de almazaras como enmiendas en la agricultura.....	40
1.3.4.2. Efecto de los residuos orgánicos en la dinámica de los plaguicidas.....	42
1.3.5. Aplicación de materiales arcillosos.....	45
1.3.5.1. Propiedades estructurales y adsorbentes de las arcillas.....	45
1.3.5.1.1. Arcillas catiónicas.....	46
1.3.5.1.2. Arcillas aniónicas.....	52
1.3.5.2. Aplicaciones de las arcillas como adsorbentes de plaguicidas.....	57

1.3.5.2.1. Barreras inmovilizadoras de plaguicidas.....	57
1.3.5.2.2. Soportes para la liberación controlada de plaguicidas.....	58
1.3.5.2.3. Filtros para la depuración de aguas.....	60
2. OBJETIVOS.....	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1. Materiales.....	69
3.1.1. Plaguicidas.....	69
3.1.1.1. Metalaxil.....	69
3.1.1.2. Imazaquín.....	70
3.1.2. Suelos.....	72
3.1.3. Adsorbentes.....	73
3.1.3.1. Residuos de almazara.....	74
3.1.3.2. Arcillas.....	74
3.1.3.3. Complejos arcilla-imazaquín.....	76
3.2. Métodos.....	77
3.2.1. Método analítico para la determinación de los plaguicidas.....	77
3.2.1.1. Análisis quiral.....	77
3.2.1.2. Análisis aquiral.....	79
3.2.2. Caracterización de los suelos.....	80
3.2.3. Caracterización de los adsorbentes.....	81
3.2.3.1. Caracterización de las enmiendas orgánicas.....	81
3.2.3.2. Caracterización de las arcillas.....	82
3.2.3.3. Caracterización de los complejos arcilla-imazaquín.....	83
3.2.4. Estudio del comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas quirales en los suelos: Experimentos de laboratorio.....	86
3.2.4.1. Estudios de adsorción y desorción.....	86
3.2.4.1.1. Adsorción de los plaguicidas a los adsorbentes.....	86
3.2.4.1.2. Adsorción de los plaguicidas a los suelos sin enmendar y enmendados.....	88
3.2.4.2. Estudios de persistencia.....	89

3.2.4.2.1. Estudios de persistencia en suelos sin enmendar y enmendados con los adsorbentes.....	89
3.2.4.2.2. Estudios de persistencia con aplicaciones sucesivas.....	91
3.2.4.2.3. Estudio de persistencia a elevada dosis de metalaxil.....	91
3.2.4.3. Estudios de lixiviación.....	92
3.2.4.3.1. Estudios de lixiviación en los suelos sin enmendar y enmendados con los adsorbentes.....	92
3.2.4.3.2. Estudio de lixiviación con adición del complejo de SA-HDTMA y R-imazaquín.....	93
3.2.4.4. Bioensayos con imazaquín.....	94
3.2.4.4.1. Bioensayo general.....	94
3.2.4.4.2. Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación.....	95
3.2.5. Estudio del comportamiento enantioselectivo del metalaxil en un suelo agrícola bajo condiciones reales de campo: efecto de la adición de arcilla modificada.....	95
3.2.6. Tratamiento de los datos.....	97
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
4.1. Caracterización de suelos y adsorbentes.....	101
4.1.1. Caracterización de los suelos.....	101
4.1.2. Caracterización de los adsorbentes.....	103
4.1.2.1. Caracterización de las enmiendas orgánicas.....	103
4.1.2.2. Caracterización de las arcillas.....	106
4.1.2.2.1. Hidrotalcitas.....	106
4.1.2.2.2. Montmorillonita modificada con HDTMA.....	119
4.2. Estudio enantioselectivo del comportamiento del fungicida metalaxil.....	123
4.2.1. Estudios de adsorción-desorción en condiciones de laboratorio.....	123
4.2.1.1. Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes.....	123
4.2.1.2. Estudios de adsorción-desorción a suelos sin enmendar y enmendados.....	129
4.2.2. Estudios de persistencia en condiciones de laboratorio.....	137
4.2.2.1. Persistencia en los suelos sin enmendar.....	139
4.2.2.2. Persistencia en los suelos enmendados con los residuos de	

almazara.....	145
4.2.2.3. Persistencia en los suelos enmendados con organo-hidrotalcita...	147
4.2.2.4. Estudio de la persistencia bajo aplicaciones sucesivas.....	150
4.2.2.5. Estudio de persistencia a elevadas dosis.....	152
4.2.3. Estudios de lixiviación en condiciones de laboratorio.....	154
4.2.3.1. Lixiviación en los suelos sin enmendar.....	155
4.2.3.2. Lixiviación en los suelos enmendados con los residuos de almazara.....	158
4.2.3.3. Lixiviación en los suelos enmendados con organo-hidrotalcita.....	162
4.2.4. Estudio del comportamiento enantioselectivo del metalaxil en un suelo agrícola bajo condiciones reales de campo: efecto de la adición de hidrotalcita modificada.....	165
4.2.4.1. Condiciones meteorológicas.....	165
4.2.4.2. Lixiviación y persistencia en condiciones de campo.....	166
4.2.4.3. Composición enantiomérica de los residuos de metalaxil.....	169
4.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio enantioselectivo del comportamiento del fungicida metalaxil.....	171
4.3. Estudio enantioselectivo del comportamiento del herbicida imazaquín.....	173
4.3.1. Estudios de adsorción-desorción.....	173
4.3.1.1. Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes.....	173
4.3.1.2. Estudios de adsorción-desorción a suelos sin enmendar y enmendados con SA-HDTMA.....	176
4.3.2. Estudios de persistencia.....	180
4.3.2.1. Persistencia en los suelos sin enmendar.....	181
4.3.2.2. Persistencia en los suelos enmendados con los residuos de almazara.....	187
4.3.2.3. Persistencia en los suelos enmendados con organo-arcilla.....	190
4.3.2.4. Estudio de la persistencia bajo aplicaciones sucesivas.....	193
4.3.3. Estudios de lixiviación.....	194
4.3.3.1. Lixiviación en los suelos sin enmendar.....	194
4.3.3.2. Lixiviación en los suelos enmendados con los residuos de	

almazara.....	199
4.3.3.3. Lixiviación en los suelos enmendados con organo-arcilla.....	203
4.3.3.4. Lixiviación en suelo tras la adición del herbicida en forma de complejo de SA-HDTMA y <i>R</i> -imazaquín.....	205
4.3.4. Bioensayos: eficacia biológica.....	212
4.3.4.1. Bioensayo general.....	212
4.3.4.2. Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación: aplicación del herbicida libre y soportado en SA-HDTMA.....	215
4.3.5. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio enantioselectivo del comportamiento del herbicida imazaquín.....	218
5. CONCLUSIONES.....	219
6. BIBLIOGRAFÍA.....	225
7. PUBLICACIONES.....	253

Los plaguicidas quirales constituyen un grupo emergente de productos fitosanitarios cuyo uso se ha extendido por todo el mundo en las últimas décadas. Estos plaguicidas pueden existir como una o varias parejas de enantiómeros, los cuales suelen presentar un comportamiento en suelos y una actividad biológica diferente. A pesar de ello, estos agroquímicos a menudo se usan, regulan y analizan como si fueran aquirales debido, en parte, al insuficiente conocimiento de los factores que determinan su posible comportamiento enantioselectivo, así como a las dificultades técnicas asociadas a la separación y análisis de los enantiómeros. El uso de plaguicidas quirales como mezcla racémica de dos enantiómeros, sin tener en cuenta que sólo uno de ellos suele ser activo contra la plaga a combatir, supone un problema medioambiental añadido, puesto que, en muchos casos, el destino final del enantiómero considerado como inactivo es desconocido, pudiendo afectar a otros organismos presentes en el suelo. Por este motivo, los gobiernos de diversos países han puesto el foco de atención en regular el uso de los plaguicidas quirales considerando los enantiómeros por separado y, en ciertos casos, han recomendado o impuesto el uso del enantiómero activo exclusivamente.

Con los resultados presentados en esta memoria se pretende profundizar en la enantioselectividad de los procesos de transporte y transformación que dos plaguicidas quirales, metalaxil e imazaquín, pueden sufrir en suelos agrícolas, así como establecer la influencia de ciertas prácticas agronómicas en dichos procesos. Entre las prácticas evaluadas destacan la adición de enmiendas orgánicas y el uso de arcillas como adsorbentes de los plaguicidas seleccionados. A pesar de que la bibliografía sobre la utilización de enmiendas orgánicas y arcillas como adsorbentes de plaguicidas es extensa, la enantioselectividad del proceso de adsorción de plaguicidas quirales en estos materiales y su efecto en la enantioselectividad de otros procesos de transporte y transformación ha sido escasamente estudiada. Una propuesta innovadora de este trabajo es la síntesis de complejos de liberación lenta del enantiómero activo soportado sobre arcilla, lo cual permitiría reducir la dosis de aplicación del plaguicida quiral a la vez que disminuir las pérdidas de agroquímico por procesos de transporte, mejorando su eficacia sobre la plaga objetivo. De este modo, los conocimientos adquiridos en esta tesis podrían contribuir a la optimización del uso de plaguicidas quirales, con el fin de aumentar su eficacia y prevenir o paliar los posibles efectos adversos ocasionados por el uso intensivo de los mismos.

Chiral pesticides have become a very important group of emerging agrochemicals widely used all over the world. These pesticides consist of one (or more) pair of enantiomers whose biological activity and behavior in soil are usually different. Even so, most of these agrochemicals are used, regulated, and analyzed as if they were achiral due to i) the scarce understanding about the factors influencing their possible enantioselective environmental behavior once applied to agricultural soils and ii) the greater complexity in separating and analyzing individual enantiomers as compared to achiral compounds. The use of chiral pesticides as a racemic mixture of their enantiomers, without considering that only one of the enantiomers may be active against the target pest, could represent serious environmental problems, since the final fate of inactive enantiomers is usually unknown and they could affect non-target organisms. For this reason, governments in several countries have realized the need to conduct exhaustive studies of the environmental behavior of enantiomers separately. On the basis of the results obtained, the use of the biologically-active enantiomer has been recommended or imposed for some chiral pesticides.

The outcomes achieved from this work are expected to improve the current knowledge about the enantioselectivity of the processes that determine the fate of two chiral pesticides, metalaxyl and imazaquin, in agricultural soils, including assessment of the influence of certain agronomic practices on such enantioselective behavior. Particular attention is paid to the effect of the addition of organic amendments to the soils and to the use of clays as sorbents of the selected pesticides. Although previous studies have addressed the use of organic amendments and clays as pesticide sorbents, research on the enantioselective sorption of chiral pesticides by these materials is scarce and their effects on the enantioselectivity of other soil transport and transformation processes have been poorly studied. An innovative proposal of this work is the design of active-enantiomer slow release formulations using clay as a support. These formulations would permit to reduce the pesticide application rate and minimize the agrochemical losses by transport processes, improving its efficacy against the target pest. The knowledge acquired in this work may be helpful to optimize the use of chiral pesticides by increasing their efficacy and reducing their environmental impact.

1. INTRODUCCIÓN



1.1. PROBLEMÁTICA MEDIOAMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS: IMPORTANCIA DE LA QUIRALIDAD

1.1.1. Marco internacional y nacional de la problemática del uso de los plaguicidas

La llamada Revolución Verde, que empezó a desarrollarse a mediados del siglo XX, dio lugar a un extraordinario crecimiento en la productividad de los cultivos alimentarios en países en desarrollo que se ha mantenido a lo largo de cincuenta años (Evenson & Gollin, 2003). Esta revolución agrícola consistió en una serie de mejoras en las técnicas empleadas en la agricultura, que supusieron un gran aumento en el rendimiento de las cosechas (Figura 1.1). Una de las técnicas más relevantes fue la fitogenética, que dio lugar al desarrollo de variedades de cultivos mejoradas, para lo cual fue necesario un incremento en el uso de fertilizantes, plaguicidas y aguas de regadío.

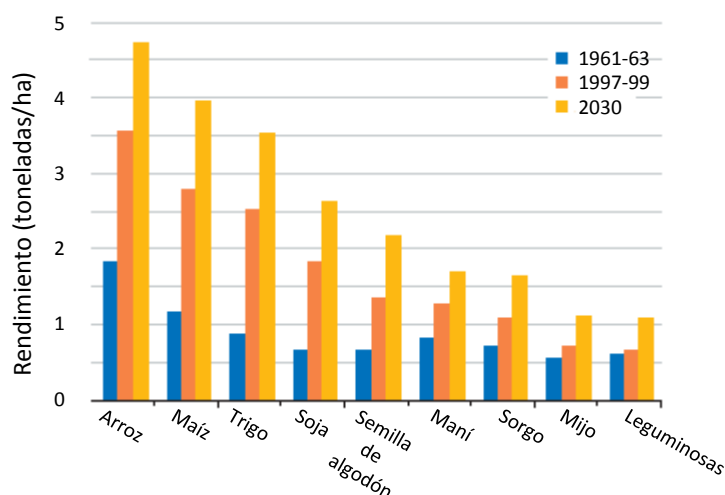


Figura 1.1. Rendimiento de algunos cultivos en países en desarrollo, 1961 a 2030 (FAO, 2002).

En los primeros años de implementación de estas técnicas, se obvió las posibles consecuencias tanto sociales como medioambientales que podrían causar. De este modo, a pesar del aumento en la producción de las cosechas, con el paso del tiempo han ido aflorando numerosas limitaciones de la Revolución Verde. Entre ellas está la uniformidad en la utilización de semillas, que reduce la biodiversidad y disminuye la capacidad de resistencia a las plagas. Por otro lado, el gran aumento en el uso de fertilizantes y pesticidas químicos requerido, cuyo consumo en los 70 se

1. INTRODUCCIÓN

dobló en el caso de los primeros y se quintuplicó en el de los segundos (Crump, 1998), ha provocado contaminación de diversos tipos y el agotamiento de muchos suelos. Además, la necesaria expansión del regadío, puesto que estas variedades de cultivo requieren gran cantidad de agua, ha dado lugar a problemas como la salinización de los suelos y el agotamiento de los acuíferos.

Actualmente, debido a las previsiones del aumento de la población mundial en las próximas décadas (Figura 1.2a), así como de la demanda de alimentos derivada de ésta (Figura 1.2b), muchas organizaciones, entre las que está la FAO, han indicado la necesidad de una nueva revolución verde cuyo objetivo sea, igual que en la primera, el aumento de la productividad de las cosechas, pero que lleve asociado la sostenibilidad (minimizando o reduciendo los efectos medioambientales de la agricultura a largo plazo) y a la equidad (asegurando que los beneficios y la investigación lleguen a los más pobres y a las áreas marginales) (FAO, 2002).

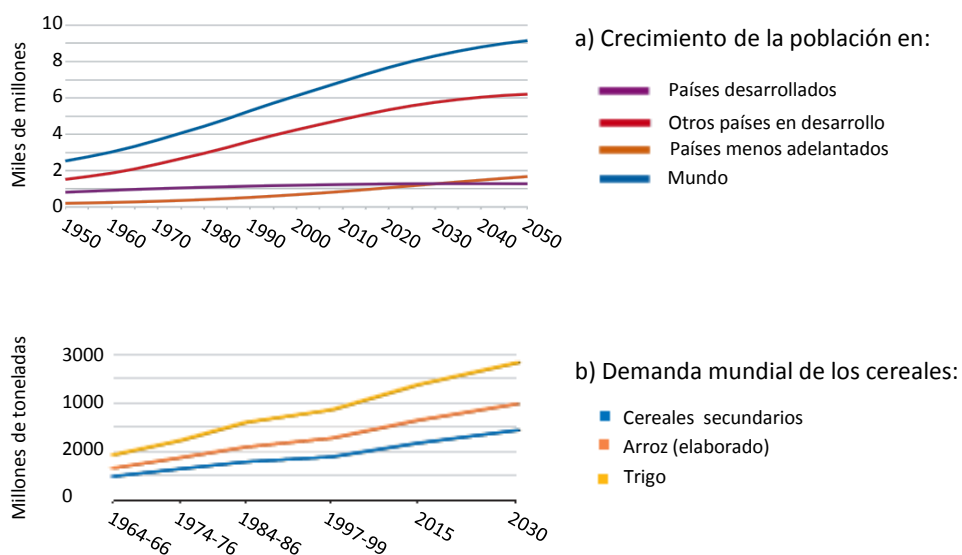


Figura 1.2. Datos y previsiones de crecimiento de la población en el periodo 1950-2050 (Fuente: División de Población de Naciones Unidas, de Van der Mensbrugghe et al., 2009) (a) y de la demanda mundial de cereales de 1965 a 2030 (FAO, 2002) (b).

Para ello, se han planteado una serie de mejoras basadas en la biotecnología, agricultura de conservación, sistemas de nutrientes vegetales integrados, así como la implantación de sistemas de Gestión Integrada de Plagas (GIP), ya que, aunque los plaguicidas se consideran actualmente indispensables para poder asegurar el abastecimiento alimentario en las próximas décadas, su uso debe ser regulado por los diferentes países para evitar problemas medioambientales.

Según el artículo 2º del *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas* (FAO, 2015), se define plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas”. Estos fitosanitarios, se aplican, según su sistema de acción (sistémico, de contacto, por inhalación, curativo o preventivo), bien sobre los cultivos bien sobre el suelo que lo soporta. Cabe destacar que sólo entre un 1% y un 20% del plaguicida que se adiciona alcanza la plaga objetivo sobre la que se quiere actuar; el resto del agroquímico aplicado se dispersa por el medio ambiente a través de diferentes procesos de transporte. Esta pérdida del plaguicida precisa la aplicación de dosis mayores, lo cual origina contaminación puntual y/o difusa de suelos y aguas (superficiales y subterráneas) tanto por el propio plaguicida como por sus productos de degradación.

En el caso específico de España, como muestra la Figura 1.3a, el consumo de productos fitosanitarios aumentó considerablemente desde el año 1995 hasta el 2004, año en el que se alcanzaron los mayores registros de consumo de estos agroquímicos por hectárea cultivada. Este aumento en el consumo de plaguicidas se atribuye a los procesos de intensificación agraria que han dado lugar a una mayor aplicación en menos superficie (MAPAMA, 2006). A partir de 2004, el consumo ha ido experimentando un ligero descenso que fue particularmente acentuado en 2009. En la década actual, la ligera disminución del consumo de plaguicidas sufrido se asocia, en parte, a la situación de crisis económica y a las condiciones meteorológicas que dieron lugar a una reducción en el consumo. No obstante, aun dándose esta disminución en el consumo de fitosanitarios, su uso es muy superior a los registrados en los años 90. Cabe destacar que para el último año evaluado, 2014, se aprecia un ligero aumento del consumo de plaguicidas del 1.3% respecto al año anterior, predominando el uso de herbicidas e insecticidas frente al resto de productos fitosanitarios (Figura 1.3b) (MAPAMA, 2015).

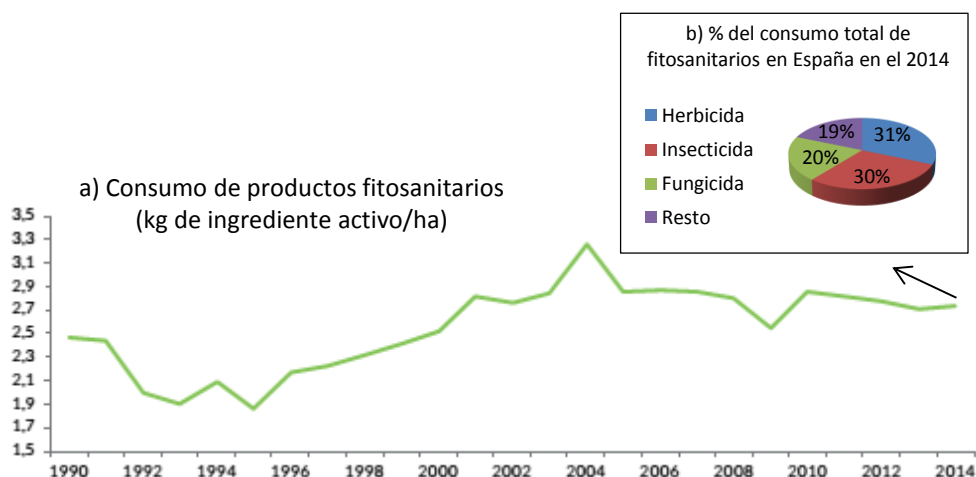


Figura 1.3. Evolución del consumo de fitosanitarios en España (a) y consumo de fitosanitarios en España por tipología en 2014 (b) (Fuente: MAPAMA, 2015).

El aumento en el consumo de productos fitosanitarios en la agricultura y en otros sectores económicos (silvicultura, transporte, zonas industriales, parques y jardines domésticos) ha dado lugar a un aumento de la presencia de residuos de plaguicidas en diferentes compartimentos ambientales como suelos, sedimentos y aguas. La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por plaguicidas en España se ha puesto de relieve en diversos estudios de monitorización de aguas (Picó et al., 1994; Sánchez-Camazano et al., 1995; Garrido et al., 2000; Pérez-Ruzafa et al., 2000; Carabias-Martínez et al., 2003; Hildebrandt et al., 2008; Hermosín et al., 2009, 2013).

Para evitar los efectos nocivos en la salud humana y en el medio ambiente derivados del uso de productos fitosanitarios, su autorización y comercialización está controlada a nivel europeo a través de la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 21 de octubre de 2009, por la que se establece un marco de actuación comunitario para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. A nivel estatal, el Real Decreto 1311/2012 de 14 de septiembre de 2012 transpone a la normativa nacional la Directiva 2009/128/CE con el objetivo de establecer las bases y contenidos del Plan de Acción Nacional (PAN) disponiendo nuevas obligaciones a todos los implicados en la utilización de los productos fitosanitarios, así como importantes novedades que van a afectar a la forma de usar los mismos. Los objetivos generales del Plan de Acción Nacional para el Uso Sostenible de Productos

Fitosanitarios, aprobado en diciembre de 2012 en la Conferencia Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural, están dirigidos a:

a) Fomentar la Gestión Integrada de Plagas (GIP), para preservar un sector agrícola, forestal y alimentario próspero, que asegure una contribución positiva al medio ambiente, mediante un modelo sostenible de producción compatible con la utilización racional de productos fitosanitarios.

b) Reducir los riesgos y efectos adversos derivados de la utilización de productos fitosanitarios, especialmente en el ámbito de la salud humana y del medio ambiente.

Todas las explotaciones agrícolas que se desarrollen en España a partir del 1 de enero de 2014 tienen que tener implantados los procesos de GIP. Para facilitar esta implementación, en el PAN se incluyen medidas para elaborar guías para diferentes cultivos, que tienen como finalidad servir de orientación a agricultores y asesores para la implantación correcta de la GIP. En el informe de resultados de aplicación de “Plan de Acción Nacional (PAN) para el Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios de 2014”, se detallan las actuaciones realizadas en este año, como por ejemplo la realización de 250 campañas de divulgación sobre uso sostenible de productos fitosanitarios, la formación de 2.350 asesores, la construcción de un grupo operativo y 7 proyectos sobre GIP, y la creación de 6 guías de GIP. En el informe antes citado se destaca, además, que la Red de Vigilancia Fitosanitaria de nuestro país alcanza los 3,6 millones de hectáreas y cuenta con 14.000 puntos de control que afectan prácticamente a 630 cultivos, áreas forestales y plagas (MAPAMA, 2015).

1.1.2. Problemas medioambientales específicos derivados del uso de plaguicidas quirales

La búsqueda de compuestos con una mayor especificidad y eficiencia para el control de malas hierbas, plagas y enfermedades de los cultivos ha llevado al desarrollo de plaguicidas con estructuras cada vez más complejas, muchas de ellas quirales. Los plaguicidas quirales son aquellos que presentan en su estructura un átomo asimétrico que da como resultado la existencia de dos formas enantioméricas (isómeros ópticos), las cuales son imágenes especulares no superponibles (Ulrich et

al., 2012). Normalmente, dicho átomo asimétrico o centro estereogénico es un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes distintos, aunque también puede darse quiralidad por la existencia de átomos de fósforo o azufre asimétricos (Hegeman & Laane, 2002) (Figura 1.4). Por otra parte, la presencia de varios átomos asimétricos en una misma molécula de plaguicida aumenta el número de estereoisómeros posibles a 2^n (2^{n-1} parejas de enantiómeros), siendo n el número de centros estereogénicos o asimétricos. En este caso aparecen también los diastereoisómeros, es decir, estereoisómeros que no son superponibles pero que no son imágenes especulares uno del otro. El sistema más aceptado para nombrar la configuración de un centro estereogénico es la denominada convención de Cahn, Ingold y Prelog, que asigna una letra *R* o *S* a cada centro en función de la distribución espacial de sus sustituyentes.

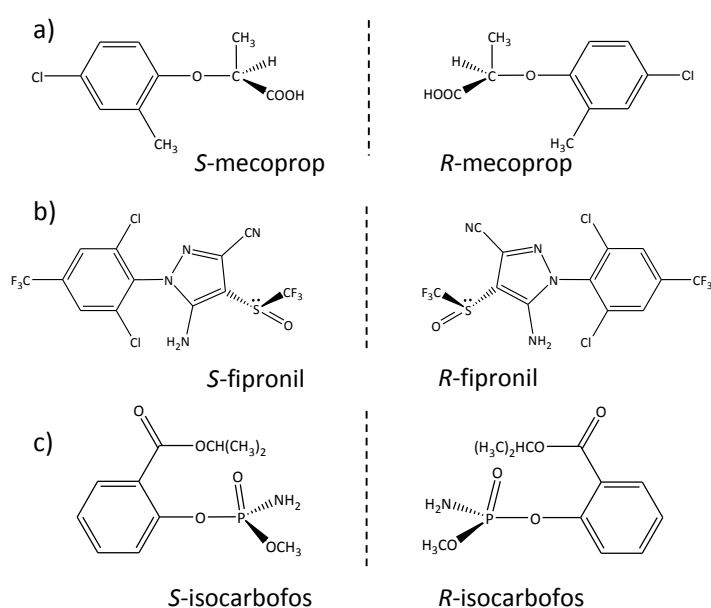


Figura 1.4. Ejemplos de plaguicidas quirales cuyos centros estereogénicos son un átomo de C (a), de S (b) y de P (c).

A diferencia de otros tipos de estereoisómeros, los enantiómeros de un determinado compuesto quiral presentan propiedades físico-químicas prácticamente idénticas, diferenciándose, principalmente, en la dirección en la que desvían el plano de la luz polarizada (a derecha o izquierda) y en su comportamiento frente a especies que también son quirales (Chen & Liu, 2008). Así, en la mayoría de los casos, la

actividad biológica de un plaguicida quiral contra la plaga diana recae principalmente sobre uno de los enantiómeros (enantiómero activo), ya que el objetivo molecular final de los plaguicidas suele ser una enzima o un receptor biológico cuyo centro activo es también quiral y por lo tanto enantioselectivo (Figura 1.5) (Chen & Liu, 2008; Garrison, 2011). Cuando se da la situación en la que un enantiómero es 10 veces más activo que el otro, solo debe considerarse a dicho enantiómero como sustancia activa, ya que esto supone que más del 90% del efecto contra la plaga se debe a este enantiómero (Magrans et al., 2002). El comportamiento y destino final del enantiómero inactivo es, en muchos casos, desconocido pudiendo, en la peor de las situaciones, afectar a otras especies no-objetivo del suelo. Por consiguiente, la aplicación de mezclas de enantiómeros o mezclas racémicas de plaguicidas supone que, a los problemas medioambientales propios de la utilización de estos productos fitosanitarios, se suma el hecho de la adición de sustancias sin funcionalidad real que podrían sobrecargar la capacidad de auto-recuperación de los suelos, así como afectar a otras especies presentes en los mismos.

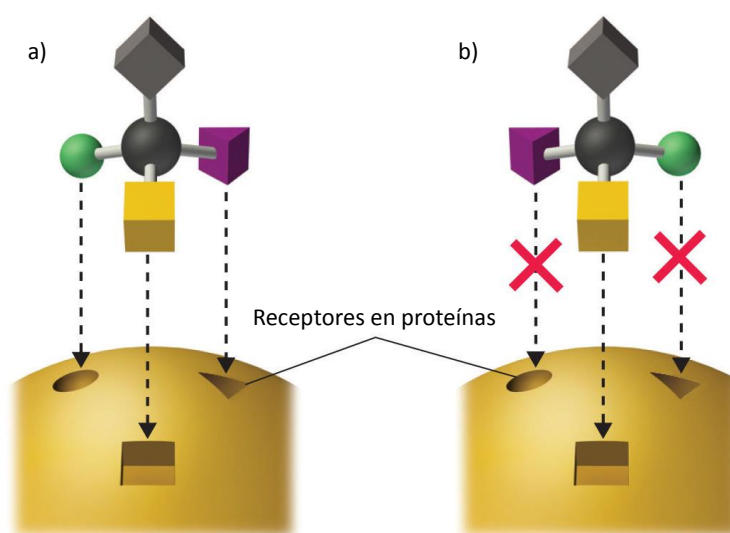


Figura 1.5. Representación esquemática de la interacción entre los dos enantiómeros de una molécula quiral y un receptor quiral de una enzima. En el caso (a), la molécula encaja en el sitio del receptor, lo cual dará lugar a una respuesta. En el caso (b), el otro enantiómero no se acomoda adecuadamente en el receptor enzimático y por consiguiente no se espera una respuesta enzimática.

Los primeros trabajos sobre el comportamiento enantioselectivo de plaguicidas quirales se remontan a la década de los 90, si bien el interés por este tipo de compuestos ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a las particulares implicaciones medioambientales que conlleva su uso (Figura 1.6).

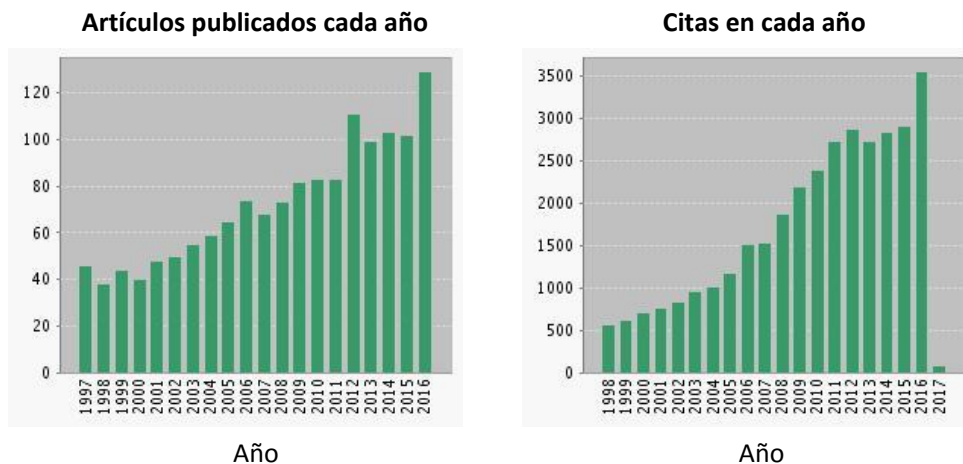


Figura 1.6. Artículos publicados y número de citas a los mismos sobre pesticidas quirales. Fuente: ISI Web of Knowledge, Web of Science-Citation Report, enero, 2017. Criterio de búsqueda: “chiral” and “pesticide”.

La aplicación de plaguicidas quirales está muy extendida por todo el mundo. Se estima que aproximadamente el 30% de los ingredientes activos de plaguicidas registrados actualmente son mezclas racémicas (1:1) de los enantiómeros de dichos plaguicidas (Sekhon, 2009) y que más del 40% de los insecticidas y herbicidas comúnmente utilizados en China son quirales (Ye et al., 2015).

En los últimos años, los países han sido más conscientes de la necesidad de realizar estudios exhaustivos sobre la posible enantioselectividad en el comportamiento y destino final de los plaguicidas quirales en el medio ambiente, llegando incluso en ocasiones a recomendarse el uso del enantiómero activo puro (Magrans et al., 2002). De este modo, sobre la base de la diferente bioactividad de los enantiómeros, varios países han tomado medidas. Las autoridades de Holanda y Suiza han revocado la licencia para el uso de mezclas racémicas de ácidos fenoxialcanoicos quirales, mientras que aprueban el registro del producto con el isómero activo puro. Otro ejemplo es Suecia, que ha implementado un impuesto en función del peso del

ingrediente activo quiral (Ye et al., 2010). En el caso de EEUU, la EPA ha emitido una política provisional sobre la reevaluación del plaguicidas quirales para su reemplazo por enantiómeros puros (EPA, 2000).

Entre las ventajas de usar el enantiómero activo frente a la mezcla racémica, además de que probablemente cause menos daño ambiental y un menor riesgo ecológico (Hegeman & Laane, 2002), está el hecho de reducir la dosis de aplicación, lo que supondría un aumento de la rentabilidad para los agricultores y una disminución en los riesgos de contaminación por contacto. No obstante, aun así, se estima que las formulaciones de plaguicidas consistentes en enantiómeros puros suponen solo el 7% del mercado de fitosanitarios actual (Liu et al., 2009). Este predominio del uso de mezclas racémicas de plaguicidas quirales se debe, en parte, a motivos económicos. Debido a la gran similitud de las propiedades fisico-químicas de los enantiómeros, las técnicas para su separación son muy complejas y costosas, lo cual hace que no resulte rentable su comercialización. Sin embargo, las exigencias a nivel europeo, con el reglamento 1107/2009 (DOUE, 2009) que obliga a especificar la identidad y contenido de isómeros/diastereoisómeros de los nuevos productos fitosanitarios registrados y clasifica como sustancias candidatas a la sustitución a aquellas que contienen una proporción significativa de isómeros inactivos, las recientes mejoras en el desarrollo de catálisis estereoselectiva por compuestos organometálicos y la aplicación de la biotecnología en la síntesis estereoselectiva, hacen cada vez más factible la producción a gran escala de enantiómeros activos puros (Magrans et al., 2002).

1.2. DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN LOS SUELOS: ENANTIOSELECTIVIDAD EN LOS PROCESOS DE TRANSFERENCIA Y TRANSFORMACIÓN

Los plaguicidas llegan al suelo a través de distintas vías: por aplicación directa al suelo, a través de las partes aéreas de las plantas, o bien pueden ser arrastrados por el viento o por el agua de precipitaciones o de riego. Una vez en el suelo, los plaguicidas se ven sometidos a una serie de procesos (Figura 1.7) que pueden dar lugar a su desplazamiento del lugar óptimo de acción o a su transformación en otros compuestos que resulten inefectivos para la plaga o que puedan afectar negativamente a otros organismos. Por todo ello, es esencial el conocimiento de todos los procesos de transporte y transformación a los que están sometidos los plaguicidas para evaluar su futura eficacia y posible impacto ambiental.

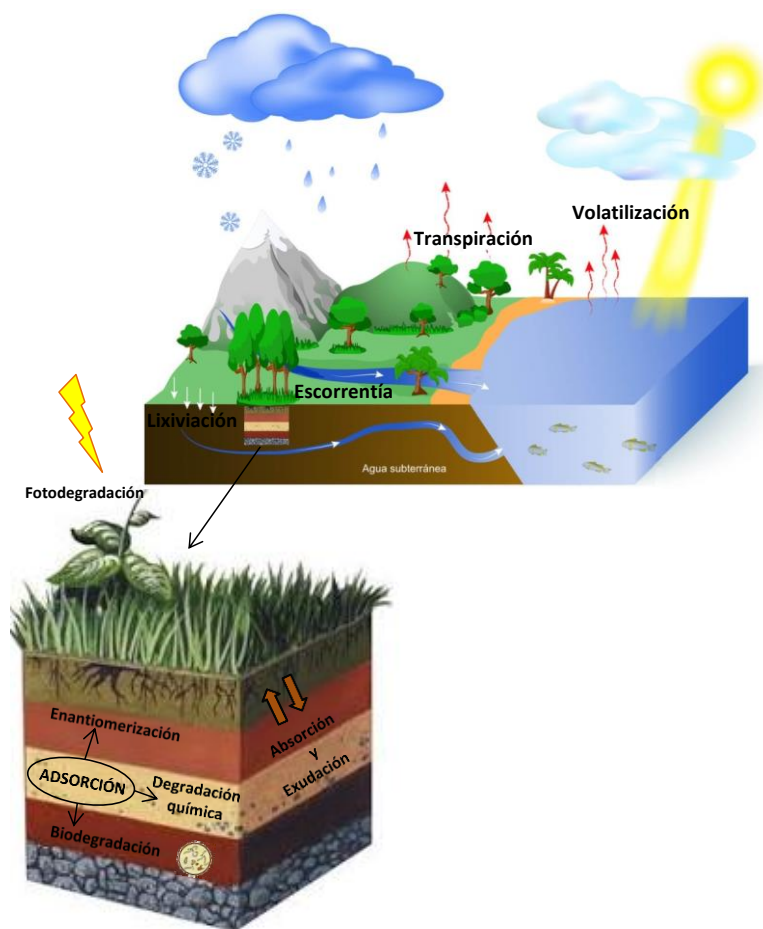


Figura 1.7. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

La dinámica de los plaguicidas en los suelos ha sido ampliamente estudiada desde hace décadas. Sin embargo, la información sobre el comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas quirales en el medio ambiente es muy limitada. Los escasos estudios que existen indican la importancia de la evaluación de los procesos de dinámica para cada enantiómero por separado, ya que estos pueden ser diferentes y estas diferencias no quedan reflejadas en los casos en los que los plaguicidas quirales se estudian considerándolos como compuestos aquirales.

1.2.1. Procesos de transferencia o transporte

Los procesos de transferencia o transporte son aquellos en los que el plaguicida se mueve de un medio a otro sin que exista ningún tipo de modificación en su estructura química. Principalmente son: adsorción-desorción, lixiviación, escurrimiento, volatilización, absorción y difusión. Puesto que los enantiómeros de un plaguicida quiral presentan idénticas propiedades físico-químicas, se prevé que los procesos de transporte no sean enantioselectivos. Sin embargo, existen ciertas situaciones particulares de estos procesos en las que intervienen especies quirales y, por tanto, en las que podría observarse enantioselectividad.

1.2.1.1. Adsorción-desorción

La adsorción es un proceso dinámico en el que un compuesto (adsorbato) pasa desde la fase acuosa del suelo (disolución) a la superficie de las partículas sólidas (adsorbente) sin que se produzcan cambios en la naturaleza química de dicho compuesto. En el caso de los plaguicidas, su adsorción en el suelo va a depender de las interacciones que tengan lugar entre las moléculas del plaguicida y los componentes del suelo, entre las moléculas del plaguicida entre sí, así como de las interacciones entre las partículas de suelo y otros compuestos presentes en la disolución del mismo. Las fuerzas de atracción que se dan en estos casos son muy variadas, pudiendo tener diferente naturaleza en función de las propiedades del soluto y de la superficie adsorbente. Así, pueden darse interacciones de tipo fuerzas de van der Waals, interacciones de tipo iónico, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes, transferencia de carga, cambio de ligando, etc.

La desorción es el proceso contrario de la adsorción, es decir, el paso del compuesto desde las partículas de suelo a la disolución acuosa del mismo. La desorción puede ser total, dándose un proceso de adsorción reversible (Wauchope & Mylers, 1985; Monkiedje & Spiteller, 2002), o puede ocurrir que se desorba sólo una parte de las moléculas, dándose una desorción parcial, o una adsorción totalmente irreversible (Cox et al., 1995; Celis & Koskinen, 1999; Fogg et al., 2003).

Cabe destacar que los procesos de adsorción-desorción son esenciales para definir el resto de los procesos que determinan la dinámica del plaguicida, ya que el grado de disponibilidad de los plaguicidas en el suelo para ser sometidos a otros procesos de transporte y/o degradación va a depender de su mayor o menor adsorción en el suelo.

a) Medida de la adsorción-desorción

Las moléculas orgánicas se adsorben y desorben de la superficie del adsorbente alcanzando un equilibrio, el cual puede expresarse como:

$$C_e \rightleftharpoons C_s$$

donde C_e es la concentración de soluto en disolución en equilibrio con el adsorbente y C_s es la cantidad adsorbida por unidad de masa del sólido.

Frecuentemente, se asume que C_s depende linealmente de C_e y se define un coeficiente de distribución, K_d , como:

$$K_d = \frac{C_s}{C_e} \quad \text{Ec. 1.1}$$

La ecuación Ec. 1.1 supone que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de adsorbato en el disolvente o fase líquida y la concentración en el sólido o fase sólida. En los casos en los que la concentración de adsorbato en la fase líquida es baja, la ecuación Ec. 1.1 suele describir de forma correcta el equilibrio. Sin embargo, en las situaciones en las que la relación entre la cantidad adsorbida y la cantidad en disolución no es lineal, el valor de K_d depende de la concentración a la cual se trabaje. De este modo, en estos casos se requiere de la obtención de las isotermas de adsorción, que se definen como la relación que describe el equilibrio

entre C_s y C_e a una determinada temperatura. Giles et al. (1960) propusieron cuatro tipos generales de isothermas de adsorción (Figura 1.8) dependiendo de la forma de la pendiente del tramo inicial, a partir de las cuales se obtiene información sobre el mecanismo de adsorción y sobre la naturaleza tanto del adsorbato como de la superficie del adsorbente.

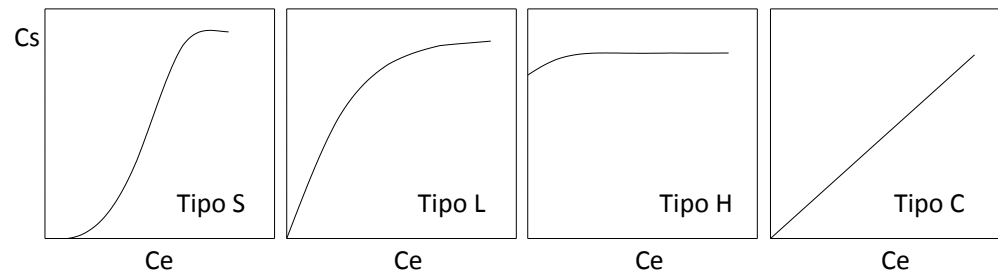


Figura 1.8. Tipos de isothermas de adsorción según la clasificación de Giles et al. (1960).

- *Isothermas tipo S:* la pendiente inicial de la curva indica que la adsorción está facilitada a elevadas concentraciones de soluto. Esto suele revelar cierta afinidad entre las moléculas de soluto adsorbidas y aquellas en disolución dándose una “adsorción cooperativa”. Este tipo de curvas son típicas de sistemas en los que se da una interacción específica entre el soluto y el adsorbente, tiene lugar una moderada atracción entre las moléculas de soluto adsorbidas y las moléculas de disolvente tienen una gran afinidad por el adsorbente, compitiendo con las moléculas de soluto por los sitios de adsorción.

- *Isothermas tipo L:* la pendiente inicial muestra que a medida que progresa la adsorción la dificultad para que las moléculas de adsorbato encuentren sitios vacantes irá en aumento. Suelen darse en los casos en los que existe una alta afinidad entre el soluto y el adsorbente, dándose una escasa competencia soluto-disolvente por los sitios de adsorción.

- *Isothermas tipo H:* se consideran un caso particular de las isothermas tipo L. En ellas, la pendiente inicial es prácticamente vertical debido a que la afinidad entre el soluto y el adsorbente es tan alta que a concentraciones bajas prácticamente todo el soluto queda adsorbido a la superficie. Son isothermas poco habituales, propias de

sistemas con adsorbatos de elevado peso molecular como miscelas iónicas o especies poliméricas.

- *Isotermas tipo C o de reparto constante*: se caracterizan por presentar una relación lineal entre la cantidad de soluto adsorbida y la concentración del mismo en la disolución de equilibrio.

Las isotermas de adsorción obtenidas experimentalmente pueden modelizarse usando diferentes ecuaciones que relacionan C_s en función de C_e . Para suelos y coloides de los suelos, las ecuaciones más utilizadas son la ecuación de Langmuir, que se ajusta bien a todas las isotermas excepto a las que presentan forma de tipo S, y la ecuación de Freundlich, que se adapta adecuadamente a todas las isotermas a excepción de las de tipo H. Puesto que en nuestro trabajo no se han obtenido isotermas del tipo H, se ha empleado el modelo de Freundlich, ya que presenta una gran versatilidad para comparar parámetros cuantificadores de la adsorción. La ecuación de Freundlich se expresa como:

$$C_s = K_f C_e^{N_f} \quad \text{Ec. 1.2}$$

o como su expresión logarítmica:

$$\log C_s = \log K_f + N_f \log C_e \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde C_s es la cantidad de soluto adsorbida a la concentración de equilibrio C_e mientras que K_f y N_f son constantes características que pueden obtenerse del ajuste lineal de los datos de $\log C_s$ vs $\log C_e$.

El valor de N_f corresponde a la pendiente de la representación lineal del $\log C_s$ vs $\log C_e$ y se considera una medida de la intensidad de la adsorción. Además, puesto que los diferentes tipos de isotermas de adsorción quedan definidas por su pendiente inicial, en función del parámetro N_f se puede asignar:

- Tipo C cuando $N_f = 1$
- Tipo L cuando $N_f < 1$
- Tipo S cuando $N_f > 1$

A partir de la ecuación Ec. 1.3, se deduce que cuando $C_e = 1$ el valor absoluto de $K_f = C_s$ y, por tanto, este parámetro puede utilizarse para evaluar la capacidad de adsorción de diferentes tipos de sistemas adsorbentes-adsorbatos siempre que las condiciones experimentales hayan sido las mismas y los valores de N_f sean similares (Hance, 1967), siendo esencial que el valor de $C_e = 1$ esté dentro o cerca del intervalo de concentraciones experimentales (Hermosín & Cornejo, 1987).

El estudio del proceso de *desorción* suele realizarse mediante diluciones sucesivas, sustituyendo parte de la disolución en equilibrio por una disolución libre de plaguicida, permitiendo que se restablezca el equilibrio. Cuando la isoterma de desorción del plaguicida no coincide con la de su adsorción, se dice que existe histéresis. El grado de reversibilidad del proceso de adsorción puede expresarse por diferentes índices. Uno de los más utilizados es el coeficiente de histéresis, H , que se define como:

$$H = \frac{N_{f-des}}{N_{f-ads}} \quad \text{Ec. 1.4}$$

donde N_{f-des} y N_{f-ads} son los coeficientes de Freundlich para la desorción y la adsorción, respectivamente. El coeficiente H puede adoptar valores entre 0, para procesos completamente irreversibles, y 1, cuando el proceso es reversible, es decir, cuando las isotermas de adsorción y desorción siguen el mismo camino (O'Connor et al., 1980; Barriuso et al., 1994).

Otro coeficiente que permite describir la histéresis del proceso de adsorción-desorción es el índice termodinámico de irreversibilidad propuesto por Sander et al. (2005), el cual se expresa como:

$$TII = 1 - \frac{N_{f-des}}{N_{f-ads}} \quad \text{Ec. 1.5}$$

En este caso, el valor de TII puede oscilar entre 0 y 1, siendo una adsorción completamente reversible cuando $TII = 0$ y completamente irreversible en los casos en los que $TII = 1$.

El proceso de histéresis puede deberse a la deformación de los poros en el adsorbente sólido, lo cual conduce a que el camino de la desorción sea diferente al de

la adsorción (Washington et al., 2003). También es posible que se hayan originado residuos adsorbidos irreversiblemente a las partículas de suelo, donde la desorción es cinéticamente muy lenta y no observable experimentalmente (Karickhoff, 1980; Celis & Koskinen, 1999). Por otro lado, la observación de histéresis también puede ser consecuencia de errores experimentales como no haberse alcanzado las condiciones de equilibrio durante la adsorción, pérdidas de partículas de adsorbente al extraer el sobrenadante, formación de precipitados, pérdidas del plaguicida por volatilización y/o degradación, así como a cambios en la composición del sistema causados durante la dilución de la disolución de equilibrio tras la adsorción (Koskinen & Harper, 1990; Gu et al., 1994).

b) Factores que afectan a la adsorción-desorción

- *Naturaleza química del plaguicida:* Una de las características físico-químicas del plaguicida que influyen notablemente en el proceso de adsorción es su estructura química, puesto que tanto la naturaleza de los grupos funcionales como su posición dentro de la molécula van a determinar la afinidad del plaguicida por los componentes del suelo. También influye la presencia y magnitud de las insaturaciones y la carga que presente el plaguicida. Por ejemplo, aquellos plaguicidas que presenten una carga positiva serán atraídos fuertemente por los filosilicatos y por las sustancias húmicas, mientras que los cargados negativamente serán repelidos, ya que estos componentes del suelo suelen presentar una carga superficial negativa. De forma inversa ocurrirá en los suelos con abundancia de óxidos metálicos, cuya superficie está cargada positivamente. Otra propiedad del plaguicida a considerar es el tamaño molecular, cuyo efecto sobre la adsorción puede ser variable. Por un lado, cuanto mayor es el tamaño molecular, más difícil resulta la entrada del plaguicida a sitios de adsorción en el interior de los microporos de algunos constituyentes del suelo como los filosilicatos y los óxidos metálicos. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que con el tamaño de las moléculas aumentan las fuerzas de van der Waals, que cuando contribuyen en la adsorción, son proporcionales a la superficie de contacto.

- *Composición coloidal del suelo:* Se pueden distinguir dos tipos de componentes coloidales del suelo: componentes orgánicos e inorgánicos. Los componentes orgánicos son los responsables de la adsorción de sustancias hidrofóbicas sin carga. Los componentes inorgánicos son principalmente filosilicatos,

que presentan alta afinidad por plaguicidas catiónicos y protonables, así como óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos metálicos, los cuales son buenos adsorbentes de compuestos orgánicos aniónicos, al presentar carga superficial positiva dependiente del pH (mayor al disminuir el pH) (Hingston et al., 1972).

- *Características de la disolución del suelo:* La característica principal a tener en cuenta es el pH, ya que de su valor dependerá la carga superficial de los componentes con carga variable del suelo, así como la posible ionización de plaguicidas con propiedades ácido-base. Otro factor relevante es la fuerza iónica, ya que su aumento disminuye la adsorción de plaguicidas ionizables debido a la competencia por los sitios de adsorción entre el soluto y los iones en disolución (Watson et al., 1973). En el caso de los plaguicidas neutros, su adsorción suele aumentar al aumentar la fuerza iónica a valores superiores de la unidad (Calvet, 1989).

c) Enantioselectividad del proceso de adsorción-desorción

Ciertos componentes minerales del suelo y regiones de la materia orgánica del mismo presentan quiralidad y, por lo tanto, podrían, potencialmente, adsorber selectivamente a los enantiómeros de los plaguicidas quirales. De hecho, se han descrito algunos casos de selectividad isomérica óptica en la adsorción de compuestos orgánicos quirales en suelos y sedimentos (Wedyan & Preston, 2005; Liu & Lee, 2007; Oravec et al., 2010). No obstante, estos casos en los que se han observado preferencias de adsorción de uno de los isómeros frente al otro son muy escasos y en la mayoría de los estudios de adsorción realizados sobre compuestos quirales ha sido imposible identificar enantioselectividad en este proceso (Matallo et al., 1998; Shaner et al., 2006; Celis et al., 2013; Gámiz et al., 2013, 2016a; Sukul et al., 2013; Qin et al., 2014). Existen diferentes motivos a los que puede atribuirse esta dificultad de detección de la adsorción enantioselectiva de los plaguicidas quirales y otros compuestos orgánicos quirales en los diferentes constituyentes del suelo. Por un lado, el predominio de sitios de adsorción aquirales en el suelo podría dificultar la observación de una adsorción quiral más minoritaria. Por otro lado, la existencia en el suelo de sitios de adsorción de enantioselectividad opuesta puede llevar a la compensación de las afinidades por uno y otro enantiómero. Por estas dos causas, puede detectarse a macroescala una ausencia de enantioselectividad durante el

proceso de adsorción a pesar de que a microescala pudiera estar teniendo lugar (Gámiz et al., 2016b).

En un estudio reciente, Celis et al. (2015a) realizaron una serie de experimentos de adsorción con el fungicida metalaxil, observando una adsorción enantioselectiva del enantiómero *R* al utilizar disoluciones iniciales enriquecidas en dicho enantiómero. Se concluyó, basándose en la forma de la isoterma de adsorción, que la presencia del enantiómero *R* adsorbido auto-inducía la adsorción preferencial de este mismo enantiómero frente al enantiómero *S*, como resultado de que, para el metalaxil en estado adsorbido, las interacciones homoquirales *R-R* podrían ser más favorables que las heteroquirales *R-S*. Este mecanismo sería compatible con la ausencia de enantioselectividad previamente observada para la adsorción del metalaxil en suelos y sus componentes a partir de disoluciones iniciales racémicas del fungicida y también explicaría hallazgos previos sobre diferencias en la adsorción de metalaxil racémico y metalaxil-M (*R*-metalaxil) en muestras minerales (Hall, 2012).

1.2.1.2. Lixiviación

La lixiviación es el proceso por el cual las precipitaciones o aguas de riego arrastran moléculas de plaguicida, materia orgánica soluble y material particulado a lo largo del perfil del suelo por efecto de la gravedad. Una de las consecuencias negativas de la lixiviación es la posible contaminación de las aguas subterráneas por plaguicidas y otros contaminantes orgánicos solubles, así como el desplazamiento del pesticida de su lugar de acción, reduciendo su efectividad sobre las plagas.

El estudio de lixiviación en el laboratorio se realiza, principalmente, mediante columnas de suelo empaquetadas a mano o de suelo inalterado. Para ello, se aplica el plaguicida a la superficie de las columnas y, a continuación, se hace pasar un determinado volumen de agua a través de ellas, simulando el proceso que ocurre en la naturaleza. El agua percolada se recoge y analiza con el fin de determinar la cantidad de plaguicida lixiviado. Tras finalizar el experimento, se extraen las columnas y se determina la cantidad de plaguicida residual a distintas profundidades de las mismas. A partir de los datos de concentraciones obtenidos, se elaboran curvas de elución en las que se representa la concentración de plaguicida de los lixiviados frente al volumen de agua adicionado (Beck et al., 1993). Estos estudios nos permiten

obtener resultados reproducibles y comparativos, así como controlar los factores que tienen influencia en la lixiviación. De este modo, se puede estudiar la movilidad de una misma molécula en diferentes suelos, la movilidad de diferentes compuestos en el mismo suelo, la influencia de la adición de diferentes enmiendas, etc.

Los estudios de campo se realizan mediante lisímetros o extracciones con barrena y tienen la ventaja de realizar los experimentos en las condiciones reales del suelo. Sin embargo, los experimentos de campo son más difíciles de interpretar debido al gran número de variables que intervienen.

a) Factores que afectan a la lixiviación

- *Adsorción de los plaguicidas a los coloides del suelo:* Existe una estrecha relación entre la adsorción de los plaguicidas y su lixiviación, de modo que cuanto mayor es la adsorción del agroquímico en los coloides del suelo, menor es su movilidad vertical. Esto supone que todas aquellas propiedades del suelo que influyen en la adsorción (pH, textura...) también afectarán a la lixiviación. Un factor importante a considerar es el contenido de materia orgánica soluble (MOS) en el suelo. La MOS, cuando se readsorbe a los coloides del suelo, puede reducir la lixiviación de los plaguicidas al aumentar su adsorción. Sin embargo, la MOS también puede ocupar sitios de adsorción del suelo liberando moléculas de plaguicidas o unirse al plaguicida formando complejos solubles que facilitan su transporte a través del perfil del suelo, favoreciendo, en ambos casos, la lixiviación (Celis et al., 1998a,b; Barriuso et al., 2011).

- *Estructura del suelo:* La lixiviación de los plaguicidas a través del suelo ocurre a través de los macroporos, donde el transporte predominante es hidrodinámico y por difusión, o a través de microporos, en los que preponderan los procesos lentos de difusión, adsorción y degradación (Cox et al., 1997a).

- *Características del plaguicida:* Las principales características de los plaguicidas que pueden influir en la lixiviación son la ionicidad, solubilidad en agua, presión de vapor y carácter hidrofóbico (Weber et al., 1980), es decir, aquellas de las que depende la retención del agroquímico en el suelo.

- *Aporte de agua:* La lixiviación del plaguicida será mayor cuanto mayor sea la intensidad y frecuencia del aporte de agua. Además, si se producen precipitaciones poco después de la aplicación del plaguicida, la lixiviación será mayor, ya que la adsorción suele aumentar con el tiempo de residencia (Wauchope, 1978; Cox et al., 1998).

- *Prácticas culturales:* La adición de residuos orgánicos y los sistemas de laboreo de conservación, modifican la composición, estructura y porosidad del suelo afectando a la lixiviación (Cox et al., 1997a).

b) Enantioselectividad del proceso de lixiviación

La lixiviación del plaguicida va a depender fundamentalmente de los procesos de adsorción-desorción y degradación de estos agroquímicos en el suelo. Por ello, la enantioselectividad de la lixiviación, entendida como la composición enantiomérica de los lixiviados, será el resultado de la posible enantioselectividad que puedan mostrar los procesos de adsorción y degradación del plaguicida. Teniendo en cuenta este hecho, Celis et al. (2013) proponen tres hipotéticas curvas de elución que pueden darse para una mezcla racémica de dos enantiómeros, las cuales se presentan en la Figura 1.9.

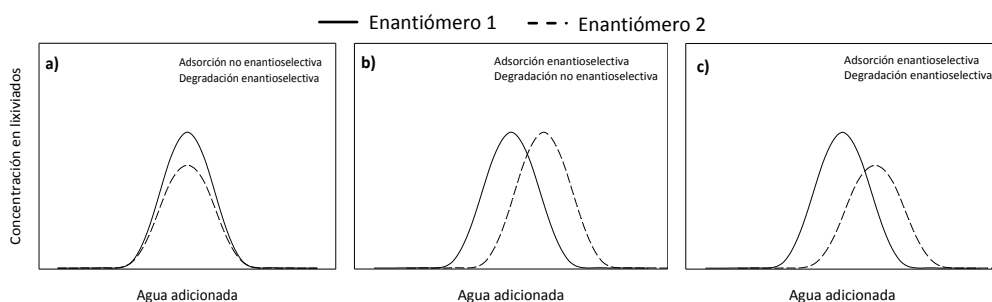


Figura 1.9. Curvas hipotéticas de elución para una mezcla racémica de dos enantiómeros en columnas de suelo donde: a) la adsorción no es enantioselectiva y la degradación sí, b) la adsorción es enantioselectiva pero la degradación no y c) tanto la adsorción como la degradación son enantioselectivas.

En el caso expuesto en la Figura 1.9a, los enantiómeros se adsorben en igual medida, pero el enantiómero 2 se degrada a mayor velocidad que el enantiómero 1 durante la lixiviación. En la Figura 1.9b, se muestra la situación en la cual el enantiómero 2 queda más retenido en el suelo que el 1, pero se degradan a la misma

velocidad y, finalmente, en la Figura 1.9c, se presenta el caso en el que tanto la adsorción como la degradación de los enantiómeros es enantioselectiva. La situación más común de las tres presentadas es aquella en la que la adsorción no presenta enantioselectividad y la degradación sí (Figura 1.9a), tal y como se ha observado en la lixiviación de los plaguicidas quirales metalaxil (Celis et al., 2013), benalaxil y furalaxil (Qin et al., 2014).

Gámiz et al. (2016b) observaron enantioselectividad del proceso de lixiviación del metalaxil al aplicar a columnas de suelo una disolución no racémica enriquecida en el enantiómero *R*. Este comportamiento se atribuyó a la mayor adsorción de este enantiómero en el suelo que se da a partir de disoluciones no racémicas enriquecidas en el mismo y que se explica por una adsorción cooperativa del *R*-metalaxil por la presencia de este mismo enantiómero ya adsorbido (Celis et al., 2015a). Para ambos enantiómeros, la cantidad total lixiviada fue de más del 95%, lo cual aseguró la escasa influencia de los procesos de degradación y enantiomerización en la enantioselectividad de la lixiviación. Este caso, que se corresponde con el mostrado en la Figura 1.8b, es uno de los pocos existentes en la bibliografía que ponen de manifiesto cómo la adsorción enantioselectiva de un plaguicida quiral puede afectar a la disponibilidad de sus enantiómeros para sufrir otros procesos medioambientales.

1.2.1.3. Otros procesos de transporte

a) Escorrentía

La escorrentía es el proceso de transporte superficial de agua y de aquellas sustancias presentes en ella que tiene lugar cuando las precipitaciones o las aguas de riego superan la tasa de infiltración del suelo. Las pérdidas de plaguicidas debidas a las aguas de escorrentía tienen lugar principalmente en disolución para los compuestos con solubilidades en agua mayores de 2 mg/l, mientras que los pesticidas de baja solubilidad en agua (< 2 mg/l) se desplazan mayoritariamente adsorbidos a los coloides del suelo (Wauchope, 1978).

Los principales factores que influyen en la escorrentía de plaguicidas son muy similares a los expuestos anteriormente para el transporte de plaguicidas por lixiviación:

- *Condiciones climáticas*: Intensidad y duración de las precipitaciones, así como la temperatura.
- *Características del suelo*: Textura, contenido de materia orgánica y humedad.
- *Propiedades de los plaguicidas*: Solubilidad, propiedades de adsorción, polaridad, persistencia y forma y dosis de su aplicación.
- *Prácticas culturales*: Cubiertas vegetales, franjas de protección y técnicas de mínimo laboreo entre otras.

Al igual que ocurría en la lixiviación, la posible enantioselectividad del proceso de escorrentía, entendida como la diferente composición enantiomérica de los residuos de plaguicida encontrados en aguas de escorrentía, dependerá del carácter enantioselectivo de la adsorción y de la persistencia de los plaguicidas quirales que se transportan en las aguas superficiales, ya que el proceso de arrastre en sí mismo no es intrínsecamente enantioselectivo.

b) Volatilización

La volatilización se define como el paso del plaguicida a la fase gaseosa desde una fase acuosa o sólida. Este proceso es muy importante ya que puede transportar al plaguicida lejos de su punto de aplicación y ser causa de contaminación difusa. Los principales factores que intervienen en la volatilización son climáticos: las precipitaciones, puesto que un aumento del agua infiltrada puede desplazar a las moléculas de plaguicidas que se encuentran adsorbidas dándose un incremento temporal de la volatilización del agroquímico; la temperatura, ya que su aumento provoca un incremento en la volatilización de los plaguicidas; y la presión atmosférica.

Puesto que las propiedades de los plaguicidas que afectan a la volatilización (presión de vapor, constante de Henry, coeficiente de partición aire-octanol) son idénticas para los enantiómeros, es esperable que la volatilización de los plaguicidas quirales no sea enantioselectiva. De este modo, la detección de proporciones no racémicas de un determinado plaguicida en la atmósfera será consecuencia de la presencia, en el suelo o agua a partir de la cual se ha evaporado, de uno de los enantiómeros en mayor abundancia (Bidleman et al., 1998).

c) Difusión

La difusión se define como el transporte del plaguicida de un punto a otro de la misma fase (suelo o agua) como consecuencia de diferencias de concentraciones. Los principales factores que afectan a la difusión son la solubilidad y la presión de vapor del contaminante, así como la temperatura, el contenido de humedad y la porosidad del suelo. Al igual que en el caso de la volatilización, las propiedades de los plaguicidas quirales de las cuales depende la difusión son análogos para sus enantiómeros, por lo que se vaticina que el transporte por difusión no será enantioselectivo.

d) Absorción

La absorción consiste en la incorporación del plaguicida presente en el suelo a las plantas a través del sistema radicular o a otros organismos como microorganismos, insectos y nematodos. La relevancia de este proceso de transporte reside en que es la vía para que los fitosanitarios se incorporen a los organismos, entrando en contacto con la plaga diana que se desea eliminar (parásitos, hongos, insectos, malas hierbas, etc.). Por otra parte, por medio de la absorción, plantas y organismos resistentes a ciertos plaguicidas pueden acumularlos y/o metabolizarlos a compuestos no tóxicos, lo que supone una fórmula natural de descontaminación de suelos (Schmidt & Fedtke, 1977).

El proceso de absorción de plaguicidas quirales puede ser enantioselectivo en plantas (Zhang et al., 2013, 2016) y en otros organismos como nematodos y microorganismos (Zipper et al., 1998). Esto se atribuye al transporte activo a través de las biomembranas, donde los isómeros de los plaguicidas quirales interaccionarían enantioselectivamente con macromoléculas quirales como las proteínas transportadoras u otros receptores quirales presentes en dicha membranas celulares, dando lugar a una absorción enantioselectiva (Zipper et al., 1998; Zhang et al., 2013). En el caso de la absorción en plantas, los plaguicidas pasan desde la disolución del suelo hasta el xilema a través del sistema radicular cruzando varias láminas de tejidos (epidermis, córtex, endodermis y periciclo), lo que supone atravesar al menos una biomembrana (Collins et al., 2006).

1.2.2. Procesos de transformación

Los procesos de transformación implican la alteración de la estructura química del plaguicida generando nuevos compuestos que puede ser menos tóxicos (inactivación o destoxificación) o más tóxicos (activación) que el compuesto original. En el caso de los plaguicidas quirales, estos procesos pueden dividirse en tres grupos según su naturaleza: procesos de degradación abiótica (degradación química y fotodegradación), procesos de degradación biológica (biodegradación) y procesos de interconversión entre enantiómeros (enantiomerización).

1.2.2.1. Procesos de degradación abiótica

a) Degradación química

La degradación química es el proceso de transformación producida por reacciones químicas hidrolíticas, de sustitución o reacciones de oxidación-reducción. Los factores más importantes que pueden influir en la degradación química en el suelo son el pH, el potencial redox, la temperatura, la composición de la disolución y los componentes de la fracción coloidal del suelo (Khan, 1980), así como la naturaleza química del plaguicida y su susceptibilidad frente a dichas reacciones. De forma general, la adsorción del plaguicida a los coloides del suelo y a la materia orgánica soluble (MOS) lo protege de la degradación química. Sin embargo, en los casos en los que las reacciones estén catalizadas por la superficie de los componentes coloidales o de la MOS, la degradación puede verse favorecida por la adsorción. Hay que señalar que este tipo de degradación tiene menos importancia desde el punto de vista cuantitativo, ya que la cinética de reacción es más lenta debido a la competencia que presentan los oxidantes por la materia orgánica.

Generalmente, se ha observado que las reacciones abióticas que afectan a los plaguicidas en el suelo no son enantioselectivas, es decir, no se detectan diferencias significativas en la velocidad de degradación de los enantiómeros de un determinado plaguicida quiral (Buser & Müller, 1995; Bidleman et al., 1998). Este comportamiento queda ratificado con los resultados obtenidos para la degradación, en condiciones abióticas, de los plaguicidas quirales α -hexaclorociclohexano, mecoprop, *cis*- y *trans*-clordano, heptacloro, *exo*-epóxido y oxiclordano, para los que, en todos los casos, la

fracción enantiomérica (EF) se mantuvo cercana a 0.5 (racémica) tras los procesos degradativos (Hegeman & Laane, 2002).

b) Fotodegradación

La fotodegradación se define como la transformación química del plaguicida promovida por la acción de la luz solar (Horspool, 1970) a través de reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución e isomerización. Los principales factores que van a afectar a este tipo de degradación son:

- *Disponibilidad de la radiación solar*: Dependerá del tiempo e intensidad de la radiación solar. Además, se requiere la presencia del plaguicida en los primeros milímetros del suelo, en la superficie de las plantas y/o en ecosistemas acuáticos, que son las zonas más susceptibles de recibir dicha radiación solar.

- *Características del suelo*: Las más significativas son el pH, el grado de aireación y la presencia de catalizadores fotoquímicos. También es muy importante el contenido de ácidos húmicos, ya que pueden absorber radiación ultravioleta disminuyendo la fotodegradación de los plaguicidas o catalizándola (Ramezani et al., 2008).

- *Propiedades del plaguicida*: Las más relevantes son la estructura química, el estado físico (sólido, disuelto o en estado gaseoso) y el grado de adsorción del plaguicida.

La degradación fotoquímica puede ser directa o indirecta. Será directa cuando la luz actúe directamente sobre el plaguicida degradándolo e indirecta cuando la energía de la radiación solar sea absorbida por otras moléculas presentes en el suelo, las cuales transmiten la energía a los plaguicidas o se transforman en productos intermedios que reaccionan con el plaguicida (Mansour et al., 1989; Cox et al., 1996; Aguer et al., 2000).

Se han llevado a cabo varios estudios para determinar la posible enantioselectividad de la fotodegradación de plaguicidas quirales en agua y suelos y en todos los casos el resultado fue que los enantiómeros se degradaban a la misma velocidad (Ali et al., 2004; Ramezani et al., 2008).

1.2.2.2. Biodegradación

La biodegradación consiste en la transformación del plaguicida por la asimilación-metabolización de microorganismos del suelo, dando como resultado compuestos minerales como NH_3 , CO_2 , H_2O o metabolitos intermedios. En general, tiene lugar mediante reacciones enzimáticas de reducción (típicas de bacterias anaeróbicas en ambientes húmedos), de oxidación o hidrolíticas (producidas por hongos y bacterias tipo aeróbicas).

Los principales factores que van a condicionar la degradación biológica son:

- *Factores climáticos*: Principalmente la temperatura y la humedad, cuyo incremento (hasta cierto límite) aumenta la degradación por favorecer el crecimiento bacteriano.

- *Grado de adsorción en el suelo*: Por lo general, para que las moléculas orgánicas puedan ser biodegradadas deben estar en disolución o biodisponibles, de modo que cuanto mayor sea la adsorción del plaguicida en el suelo, menor será la biodegradación.

- *Contenido de materia orgánica en los suelos*: El efecto de la materia orgánica puede ser variable. Por un lado, puede adsorber al plaguicida protegiéndolo de la biodegradación. Por otro lado, la materia orgánica puede ser utilizada como sustrato nutritivo por los microorganismos, favoreciendo el crecimiento de su población y, con ello, los procesos biodegradativos.

La biodegradación de los plaguicidas en el suelo es consecuencia de la acción de las enzimas (y receptores biológicos) de diferentes microorganismos. Los centros activos de estas macromoléculas suelen ser quirales, de modo que, a pesar de la similitud química de los enantiómeros de un plaguicida quiral, la fuerza de asociación centro activo-enantiómero suele ser diferente para cada uno de ellos (Magrans et al., 2002). Por consiguiente, las enzimas encargadas de la degradación se unirán preferentemente a uno de los enantiómeros degradándolo a mayor velocidad que al otro. Se debe destacar que, además de la acción de las enzimas intracelulares de los microorganismos, Kalathoor et al. (2015) encontraron cierta contribución a la biodegradación del metalaxil de enzimas extracelulares presentes en el suelo, a través de estudios de persistencia realizados con suelos sometidos a diferentes procesos de esterilización.

Los estudios realizados sobre los factores que pueden afectar a la enantioselectividad de la degradación biológica de plaguicidas quirales en suelos y aguas han señalado que dicha degradación dependerá fundamentalmente de las propiedades del suelo que den lugar a cambios en las poblaciones microbianas. Una de las propiedades del suelo más importantes de cuya variación puede depender la enantioselectividad de la degradación de un determinado plaguicida es el pH. Esto se debe a que cambios en el pH pueden afectar a nivel de los microorganismos degradadores (por ejemplo con un predominio de población microbiana que degrade preferentemente al enantiómero *S* o *R*) o a nivel molecular (por ejemplo por activación/inactivación de enzimas enantioespecíficas) (Buerge et al., 2003). Otras propiedades igualmente importantes son la textura, las condiciones redox y la disponibilidad/ausencia de oxígeno. Hay que destacar que el predominio de microorganismos que degraden preferentemente un enantiómero sobre el otro, normalmente, no depende de una sola de las propiedades anteriormente mencionadas, sino del efecto de la combinación de varias. A continuación, se presentan algunos ejemplos que ilustran las diferencias en la enantioselectividad de la biodegradación de plaguicidas quirales en diferentes condiciones.

Buerge et al. (2003) encontraron que en suelos aeróbicos con valores de pH > 5 el enantiómero *R* del fungicida metalaxil se degradaba más rápidamente que el enantiómero *S*, mientras que en suelos aeróbicos con valores de pH < 4 y en suelos anaeróbicos la enantioselectividad del proceso de degradación del metalaxil era inversa. Müller & Buser (1995) encontraron preferencia de la degradación del *S*-metalaxil frente al *R*-metalaxil en lodos de depuradoras anóxicos a pH neutro. Estos resultados indican que el efecto del pH sobre la población microbiana será diferente en función de la disponibilidad de oxígeno. Otro caso es la degradación del benalaxil, en la que el enantiómero *R* se degrada a mayor velocidad que el enantiómero *S* en suelos aeróbicos y dicha enantioselectividad está más acentuada cuanto más alcalino son los valores de pH de los suelos. En suelos con pH ácido, la biodegradación no es enantioselectiva (Wang et al. 2007a; Qin et al., 2014).

Otro ejemplo interesante es la degradación del insecticida fipronil, que en condiciones aeróbicas no es enantioselectiva, mientras que en condiciones de inundación (anaeróbicas) es altamente enantioselectiva, con una degradación más rápida del enantiómero *S* frente al *R* (Tan et al., 2008). Sin embargo, en otro estudio

de degradación en lodos de sedimentos de agua dulce anóxicos, se encontró que a $\text{pH} \approx 7$ y potencial redox metanogénico el *S*-fipronil se degradaba más rápidamente, mientras que en lodos con $\text{pH} = 7.8$ y potencial sulfidogénico el enantiómero que se degradaba a mayor velocidad era el *R*-fipronil (Jones et al., 2007).

Otra propiedad del suelo que puede afectar a la enantioselectividad de la degradación de ciertos plaguicidas quirales es la textura, probablemente por tener influencia en las poblaciones microbianas. Romero et al. (2001) observaron que en el caso de los herbicidas mecoprop y dicloroprop, el enantiómero *R* se degradaba a mayor velocidad en suelos franco-limosos y franco-arenosos, mientras que en suelos franco arcillosos, el enantiómero que se degradaba preferentemente era el *S*.

1.2.2.3. Enantiomerización

La enantiomerización se define como la transformación de un enantiómero en el otro. Es un proceso que requiere gran cantidad de energía, de modo que, normalmente, tiene lugar a través de un carbono quiral metino, excepto en ciertos casos en los que por procesos de absorción de luz UV se obtiene suficiente energía para la rotura homolítica de enlaces (C-C) (Katagi, 2012). Se diferencian dos tipos de enantiomerización: abiótica y biótica.

La *enantiomerización abiótica* es debida principalmente a reacciones de hidrólisis o de fotólisis. La enantiomerización vía hidrólisis es un proceso que requiere catálisis ácida o básica, por lo que el pH es una propiedad esencial de los suelos y aguas de la cual depende este proceso de transformación (Figura 1.10). El tipo de catálisis dependerá del compuesto y de la estabilidad del intermedio de reacción que se forme. Así, se ha observado la racemización abiótica del $\alpha S, 2S$ - y $\alpha S, 2R$ -fenvalerato en $\alpha R, 2S$ - y $\alpha R, 2R$ -fenvalerato respectivamente y del *S*-fenpropatrín en *R*-fenpropatrín en suelos alcalinos ($\text{pH} = 8.2$), mientras que en suelos ácidos ($\text{pH} = 5.4$) los enantiómeros puros de estos insecticidas fueron configuracionalmente estables (Li et al., 2009).

La enantiomerización de plaguicidas quirales mediante fotólisis no requiere de un catalizador ya que estos compuestos obtienen la energía necesaria para que se dé la reacción a partir de la absorción UV de la luz solar natural del medio (Katagi,

2012). Este tipo de inversión quiral es típica de los insecticidas quirales del grupo de los piretroides, como permetrina y cipermetrina (Qui & Gan, 2007).

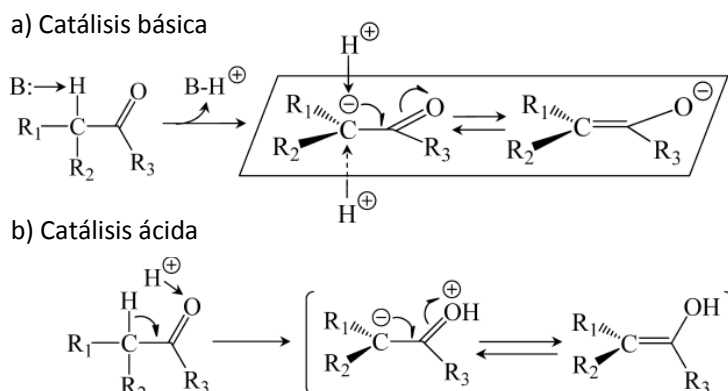


Figura 1.10. Ejemplos de mecanismos de enantiomerización/racemización abiótica de un plaguicida quiral a través de catálisis básica (a) y ácida (b) (Katagi, 2012).

La *enantiomerización biótica* es aquella en la que la transformación quiral está mediada por enzimas de microorganismos presentes en el suelo. Estas enzimas pertenecen principalmente al grupo de las racemasas, las cuales son las encargadas de catalizar la inversión estereoquímica en el carbono asimétrico de un enantiómero (Tanner, 2002).

Algunos estudios han remarcado la importancia de la enantiomerización debido a que la transformación enantioselectiva de ciertos plaguicidas quirales no sólo es consecuencia de la degradación preferencial de uno de los enantiómeros sino también de su interconversión en el otro enantiómero (Müller & Buser, 1997; Romero et al., 2001). En otros casos, la degradación del enantiómero es mucho más rápida que la conversión quiral en cualquier dirección, de modo que a pesar de que pueda darse, no se tiene en consideración (Buser & Müller, 1995). Desde el punto de vista práctico, la enantiomerización es un proceso muy relevante ya que la aplicación del enantiómero activo purificado de un plaguicida quiral en lugar de la mezcla racémica correspondiente puede llegar a carecer de sentido si el proceso de enantiomerización o racemización vuelve a formar rápidamente el enantiómero inactivo durante el almacenaje o tras la aplicación del producto.

1.3. EFECTO DE DIVERSAS PRÁCTICAS AGRONÓMICAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LOS PLAGUICIDAS QUIRALES

1.3.1. Adición del plaguicida en forma de enantiómero activo puro

Como se ha mencionado en apartados anteriores, los enantiómeros de un plaguicida quiral presentan propiedades fisico-químicas análogas, pero su comportamiento ante procesos biológicos suele ser diferente. Esto se debe a que los procesos biológicos normalmente implican reacciones enzimáticas, en las cuales la enzima y el sustrato establecen interacciones enantioespecíficas. De este modo, en la mayoría de los casos, la actividad contra la plaga objetivo recae principalmente sobre uno de los dos enantiómeros del plaguicida quiral. Esto supone que al usar estos plaguicidas en su forma racémica, solo la mitad de la dosis aplicada (la que corresponde al enantiómero activo) resultará efectiva contra la plaga, mientras que el destino final del otro enantiómero es incierto, pudiendo afectar a otras especies (Magrans et al., 2002; Garrison, 2006; Ye et al., 2015). Por ello, en los últimos 5-10 años se ha promovido en Europa y Estados Unidos el uso de formulados fitosanitarios basados en enantiómeros puros o disoluciones enriquecidas en el enantiómero activo de ciertos plaguicidas quirales en lugar de en las mezclas racémicas de los mismos (Garrison, 2006). La adición del enantiómero activo puro presenta la ventaja de reducir la dosis de aplicación del plaguicida a la mitad, lo cual conlleva una reducción de la carga contaminante sin que la eficacia biológica contra la plaga a combatir se vea comprometida (Sekhon, 2009).

Un ejemplo concreto de los beneficios medioambientales de la aplicación del enantiómero puro es la aplicación del enantiómero activo *R*-metalaxil en lugar del compuesto racémico. Se ha demostrado que el efecto de la mezcla racémica y del metalaxil-M (*R*-metalaxil) sobre la infección causada por *Plasmopara helianthi* en plantas de girasol fue idéntico, con la diferencia de que al aplicar la mezcla racémica se adicionó una cantidad de *S*-metalaxil que no tuvo ningún efecto sobre la enfermedad (Zadra et al., 2002), siendo además este enantiómero mucho más persistente en el suelo que el enantiómero activo (Marucchini & Zadra, 2002). Por otra parte, en estos estudios se observó una ausencia de enantiomerización del *R*-metalaxil en *S*-metalaxil tanto en suelos como en las plantas de girasol (Marucchini & Zadra, 2002; Zadra et al., 2002).

A pesar de las ventajas del uso de enantiómeros puros en lugar de mezclas racémicas que varios estudios han presentado (Hegeman & Laane, 2002; Sekhon, 2009), la producción a gran escala del isómero activo puro no está generalizada debido, en parte, a que su fabricación es mucho más costosa que la elaboración de la correspondiente mezcla racémica. Esto podría justificar, en algunos casos, la comercialización de la mezcla racémica en lugar del enantiómero activo puro (Magrans et al., 2002). Sin embargo, actualmente se han desarrollado nuevas técnicas de separación basadas en el uso de catalizadores enantioselectivos, la aplicación de la biotecnología en la síntesis enantioselectiva y el uso de columnas cromatográficas quirales dirigidas a optimizar los procesos de obtención de enantiómeros puros (Magrans et al., 2002). Todas estas mejoras en la síntesis de compuestos quirales pueden favorecer la sustitución de las mezclas racémicas por los enantiómeros activos puros antes, incluso, de que la legislación lo imponga, como ya ha ocurrido en el caso del metalaxil-M, benalaxil-M y mecoprop-P en algunos países (EU Pesticide Database, 2017). Por otro lado, existen plaguicidas quirales cuya licencia de la formulación racémica ya ha sido revocada en la UE y sólo se permite el uso de sus enantiómeros activos como son: diclorprop-P, dimetenamida-P, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, haloxifop-P, quizalofop-P y S-metolaclocloro (Sekhon, 2009; EU Pesticide Database, 2017). En el caso de este último plaguicida quiral, con dos centros estereogénicos, el 95% de la actividad herbicida recae en los enantiómeros 1'S, lo cual dio lugar a que el uso exclusivo del S-metolaclocloro se generalizara en la década de los 90 en varios países del mundo (Estado Unidos en 1997, Suiza en 1997, Canadá en 1998, Sudáfrica en 1998 y Australia en 1999) (Buser et al., 2000). La formulación comercial de S-metolaclocloro contiene un 86% de enantiómeros 1'S, permitiendo una reducción del 40% en la cantidad de plaguicida que necesita ser aplicado para alcanzar el mismo efecto que se obtiene usando la mezcla racémica correspondiente (Garrison, 2006).

Un factor muy importante a considerar antes de implantar el uso de enantiómeros puros en lugar de las mezclas racémicas son los posibles procesos de transformación que puede sufrir el enantiómero puro en el suelo. Por ello, se requiere un exhaustivo estudio del comportamiento de los enantiómeros por separado para evaluar si al aplicar el compuesto puro, este puede verse sometido a degradación y/o enantiomerización a una velocidad que no haga factible ni rentable su utilización. Un ejemplo es el herbicida mecoprop, en el que su enantiómero *R* (mecoprop-P) es comúnmente comercializado, llegando a ser la única forma del plaguicida registrado

en algunos países como Suiza. Este plaguicida se caracteriza por presentar enantiomerización en suelos, en la que el *S*-mecoprop se transforma en *R*-mecoprop y vice-versa, dándose un equilibrio cuya constante favorece la formación del enantiómero *R*. Respecto a la biodegradación, el proceso es enantioselectivo con una degradación más rápida del *S*-mecoprop. Por ello, la composición de mecoprop en los suelos a partir del producto registrado mecoprop-P suele presentar [*R*-enantiómero] > [*S*-enantiómero] (Müller & Buser, 1997). Así, el hecho de que el conjunto de procesos que experimenta el enantiómero *R* en el suelo (degradación y enantiomerización) dé lugar a un predominio del enantiómero activo hace que la comercialización del enantiómero puro sea viable. Varios gobiernos europeos han impuesto que tanto el mecoprop como el dicloroprop (el cual presenta el mismo comportamiento que el mecoprop) sean usados sólo como su enantiómero activo *R* puro (Garrison, 2006).

1.3.2. Aplicaciones sucesivas del plaguicida

La aplicación de un plaguicida en un determinado suelo en campañas anteriores puede afectar a la velocidad de degradación del plaguicida adicionado en el futuro. El efecto de la presencia de residuos de plaguicida en la disipación tras una nueva aplicación puede ser muy diverso. Cox et al. (1996) observaron que la degradación del herbicida isoproturón aumentaba de velocidad al aumentar el número de aplicaciones de plaguicida (Figura 1.11). Este aumento se atribuyó a la adaptación microbiana al herbicida, que llevó a un metabolismo más rápido del mismo. Otros posibles motivos de la aceleración de la degradación de plaguicidas en suelos con una historia de aplicación previa es la utilización de dichos plaguicidas como alimento por parte de los microorganismos degradadores, favoreciendo su proliferación (Fang et al., 2012), así como alteraciones en la estructura de las comunidades bacterianas (Wang et al., 2015). Comportamientos similares se han observado en las aplicaciones sucesivas de triadimefón (Fang et al., 2012), atrazina (Martinazzo et al., 2010), tebuconazol (Potter et al., 2005) y metalaxil (Wang et al., 2015), entre otros. Este aumento en la velocidad de degradación de los plaguicidas puede hacer que sea necesario incrementar la dosis de aplicación de estos, lo cual conlleva un encarecimiento de los tratamientos de control contra las plagas y un mayor impacto ambiental.

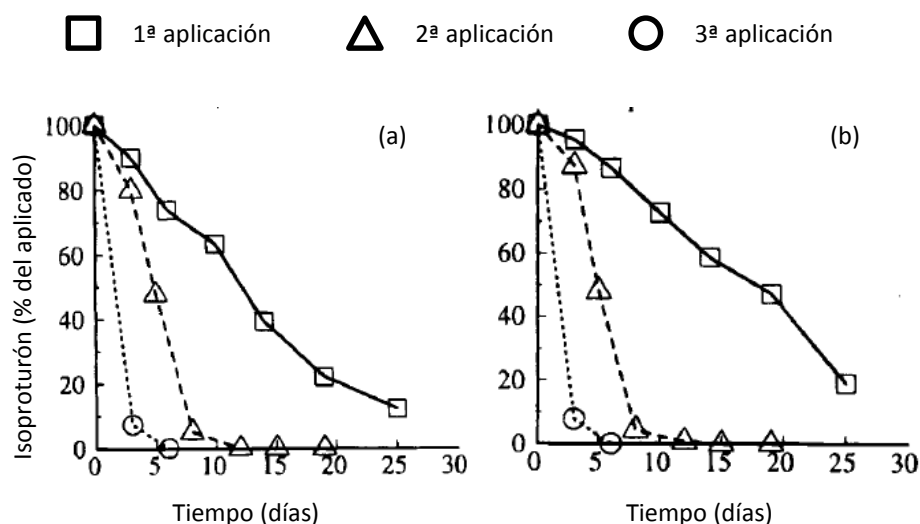


Figura 1.11. Curvas de degradación de isoproturón en incubaciones de laboratorio bajo tres aplicaciones sucesivas del herbicida en un suelo sin historia previa de aplicación (a) y un suelo con historia previa de 4 años de aplicación en campo (b) (Cox et al., 1996).

Por otro lado, Motonaga et al. (1998) observaron que el plaguicida clorotalonil fue más persistente tras una segunda aplicación del mismo. Esta menor velocidad de degradación se atribuyó al posible efecto tóxico del fungicida o de sus metabolitos sobre los microorganismos degradadores del clorotalonil. Por su parte, varios herbicidas pertenecientes al grupo de las imidazolinonas (imazamox, imazapir, imazapic, imazetapir e imazametabenz) no mostraron diferencias significativas en su disipación al comparar suelos con historia previa de aplicación y suelos control (Bundt et al., 2015). El aumento de la persistencia de los plaguicidas en el suelo tras aplicaciones sucesivas puede dar lugar a problemas medioambientales, ya que puede darse una acumulación de residuos en el suelo que llegue a suponer una sobrecarga para su atenuación natural.

Hay que tener en cuenta que el efecto de las aplicaciones sucesivas en la degradación de un determinado plaguicida quiral puede ser diferente dependiendo del enantiómero considerado. Un ejemplo concreto de este hecho es el fungicida metalaxil. Wang et al. (2015) observaron que una tercera aplicación de metalaxil en suelos conducía a una degradación más rápida del fungicida al compararlo con la velocidad de una segunda aplicación. De este modo, concluyeron que al aumentar la

frecuencia de las aplicaciones se daba una aceleración en la degradación del fungicida. Sin embargo, si en lugar de realizar el estudio de la persistencia considerando el fungicida como un compuesto aquiral, se lleva a cabo midiendo la velocidad de degradación de los enantiómeros por separado, el resultado es diferente. En ese caso, la aplicación continuada de metalaxil reduce progresivamente la persistencia del enantiómero *R* y aumenta la persistencia del enantiómero *S* (Celis et al., 2015b). Este ejemplo nos indica la necesidad de evaluar por separado el comportamiento de los enantiómeros de plaguicidas quirales en los suelos en los que se haya aplicado anteriormente el plaguicida, ya que puede afectar de forma diferente a cada uno de ellos.

1.3.3. Encalado de los suelos

El encalado es una práctica agrícola muy común que consiste en la aplicación de determinados compuestos alcalinos a los suelos con el fin de elevar su pH, lo cual mejora algunas de las propiedades físico-químicas y biológicas de los mismos. Los suelos a tratar pueden ser ácidos por su origen, como es el caso de los suelos tipo acrisol, alisol, podzol, así como de los más extremos fluvisol y cambisol típicos (WRB, 2014). También pueden ser suelos que se han acidificado por procesos naturales como la descalcificación o la presencia de ácidos orgánicos excretados por las raíces de las plantas. Por último, puede darse acidificación por procesos antropogénicos como la aplicación de fertilizantes nitrogenados o emisiones de contaminantes originados en procesos de generación de energía, industria y transporte que pueden depositarse en el suelo o dar lugar a lluvias ácidas. Los materiales que se utilizan para el encalado son carbonatos, óxidos, hidróxidos y silicatos de calcio y/o magnesio, siendo el más utilizado el conocido como cal agrícola o calcita, que está constituido principalmente por carbonato de calcio.

En el caso de España, los suelos del norte y de la parte más occidental son ácidos, mientras que el resto son la mayoría alcalinos (Figura 1.12).

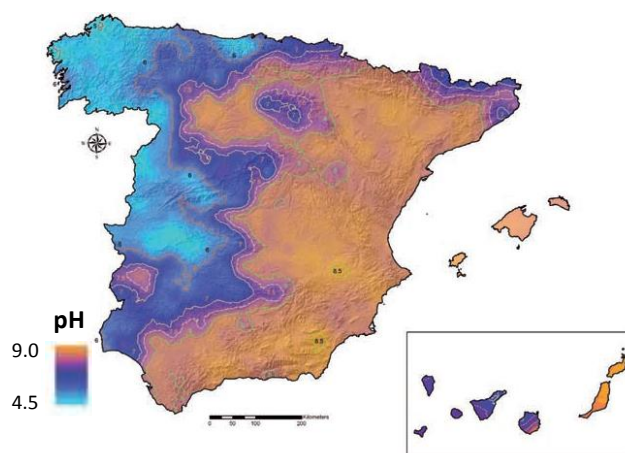


Figura 1.12. pH de los suelos de España (Fuente: MAPAMA, 2009)

Los productos más utilizados en el territorio español son la caliza comercial, la cal viva o apagada, la dolomita, que presenta la ventaja de que además de aportar calcio proporciona también magnesio, y las espumas de azucarera. Todos los productos que se utilicen en el territorio español deberán ajustarse a los tipos, características y especificaciones del Anexo I del R.D 824/2005 (MAPAMA, 2009).

La dosis de enmienda cálcica y magnésica dependerá de la textura del suelo y del nivel de acidez. De este modo, un suelo arcilloso requeriría triplicar la dosis respecto a la de un suelo arenoso. En la Tabla 1.1 se muestran las necesidades medias para incrementar progresivamente el pH del suelo (Cadahía, 2005). Este aumento debe ser progresivo (no más de 0.5 unidades al año) para evitar que el aporte pueda favorecer la eliminación de la materia orgánica del suelo.

Tabla 1.1. Necesidades medias de caliza pura finamente dividida para incrementar 0.5 unidades de pH al suelo en función de su pH inicial, textura y composición orgánica (t/ha).

Tipo de suelo	pH inicial			
	4.5-5.0	5.0-5.5	5.5-6.0	6.0-6.5
Arenoso	0.35	0.35	0.40	0.50
Franco-arenoso	0.50	0.60	0.70	0.90
Franco	0.85	0.95	1.05	1.25
Franco-limoso	1.30	1.40	1.50	1.70
Franco-arcilloso	1.60	1.80	2.00	2.50
Orgánico	3.60	3.80	4.00	4.50

Uno de los efectos del aumento del pH por el encalado es la reducción de la solubilidad de la mayoría de los metales pesados. De este modo, esta práctica puede reducir la lixiviación de metales a aguas subterráneas y disminuir su absorción por plantas dando lugar, por consiguiente, a mejoras en la calidad de los suelos y en la salud humana (Fageria, 2002).

Asimismo, el encalado puede modificar el comportamiento de compuestos orgánicos polares ionizables cuya carga sea dependiente del pH. Así, en el caso de plaguicidas que sean ácidos débiles, el incremento del pH puede dar lugar a la transformación del agroquímico en su forma aniónica y, por consiguiente, a una reducción en su adsorción a los coloides del suelo. Un caso concreto son los plaguicidas pertenecientes al grupo de las imidazolinonas, para los que tanto su adsorción como su degradación están íntimamente ligadas al pH del suelo. Aichele et al. (2005) demostraron que a pH= 5 la adsorción de varias imidazolinonas (imazaquín, imazamox e imazetapir) era mayor que a pH=7, ya que a pH neutro los plaguicidas presentaban carga negativa y establecían interacciones repulsivas con los coloides del suelo, cargados también negativamente a este valor de pH. Además, se observó que la persistencia de estos plaguicidas era mayor a pH= 5, ya que cuanto mayor es la adsorción, menor es la cantidad de agroquímico disponible en el suelo para ser degradado. Por otro lado, Stougaards et al. (1990) comprobaron que la disminución de la adsorción causada por el aumento del pH daba también como resultado un aumento de la lixiviación y de la fitotoxicidad sobre las malas hierbas. En el caso del herbicida atrazina, el cual es una base débil, estudios de campo han demostrado que el incremento del pH por encalado en un suelo franco-limoso aumenta la fitotoxicidad de esta triazina (Best et al., 1975; Kells et al., 1980). Este efecto se atribuye a que el aumento del pH da lugar a una menor adsorción por un predominio de la forma neutra en lugar de la forma catiónica. La menor adsorción supone mayor disponibilidad del herbicida para ser absorbido por las plantas, lo que supone un aumento en la toxicidad.

Respecto a los plaguicidas quirales, como se ha comentado en apartados anteriores, la degradación enantioselectiva suele estar asociada a procesos biológicos fuertemente dependientes del pH. Buerge et al. (2003) investigaron si el cambio del pH de los suelos podía influir en la enantioselectividad de la disipación del fungicida metalaxil. Para ello, trataron un suelo con pH= 4.0, en el cual no se observó

enantioselectividad en la degradación, con ácido (H_2SO_4) y con base (CaCO_3). Los resultados fueron que la degradación pasó de no ser enantioselectiva en el suelo original a ser enantioselectiva en los suelos tratados, con una degradación más rápida del enantiómero *S* en el suelo acidificado y del enantiómero *R* en el suelo encalado. Estos cambios en la enantioselectividad pueden atribuirse a la dependencia de las reacciones enzimática del pH o al predominio de poblaciones microbianas que degraden preferentemente a uno de los enantiómeros a ciertos valores de pH. En esta misma línea, Acosta-Martínez & Tabatabai (2000) encontraron que el incremento del pH del suelo como consecuencia del encalado podría estimular a la población y diversidad microbiana dando como resultado un incremento en la actividades enzimáticas.

1.3.4. Aplicación de enmiendas orgánicas

La aplicación de enmiendas orgánicas es una práctica recomendada para mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos agrícolas, que aumenta su contenido en materia orgánica, su capacidad de retención de agua y la porosidad (Tester, 1990). También mejora la estructura del suelo, la disponibilidad de nutrientes, la actividad biológica y la fertilidad, lo cual puede ayudar a la restauración de suelos degradados (Melero et al., 2007; Badalucco et al., 2010). Además, se sabe que la adición de enmiendas orgánicas a los suelos puede influir en el mecanismo de adsorción de plaguicidas, lo cual afectaría al conjunto de procesos de dinámica de estos agroquímicos en los suelos y con ello a su distribución final en el mismo (Si et al., 2006). De este modo, se ha observado que en suelos con un alto contenido de materia orgánica, endógena o exógena, las pérdidas de plaguicidas por lixiviación y escorrentía son menores que en los casos de suelos pobres en materia orgánica (Fernandes et al., 2006; Cabrera et al., 2009), dando como resultado una disminución del riesgo de contaminación de aguas subterráneas y superficiales (Cox et al., 1997b).

Los primeros trabajos sobre el efecto de la adición de enmiendas orgánicas en el comportamiento de plaguicidas en suelos se remontan a finales de los años 80 (Azam et al., 1998). A partir de entonces, debido a los beneficios de esta práctica, se han realizado estudios adicionando a los suelos enmiendas orgánicas de diferentes orígenes entre las que se encuentran la turba y el carbón vegetal (Si et al., 2011), residuos sólidos urbanos, (Cox et al., 2001), lodos de depuradora (Celis et al., 1998a,b;

Sánchez et al., 2003; González et al., 2008) y residuos de la industria agroalimentaria (Businelli, 1997; Marín-Benito et al., 2009), entre otros. Dentro de este último grupo, los residuos tanto líquidos (alpechín) como sólidos (orujo y alperujo) generados durante la producción del aceite de oliva han sido ampliamente estudiados en los últimos años.

1.3.4.1. Uso de residuos de almazaras como enmiendas en la agricultura

A partir de los años 90 se implantó un nuevo modelo de extracción del aceite de oliva en dos fases que sustituiría al anterior modelo de tres fases, el cual presentaba problemas medioambientales por generar un elevado volumen de agua residual. Este modelo se instauró rápidamente en España, llegando a implementarse en casi el 100% de las almazaras del país (Roig et al., 2006). En otros países europeos, la entrada de este nuevo modelo fue más lenta y en países como Italia y Grecia todavía se utilizaba mayoritariamente el modelo de tres fases a comienzo del siglo XXI (según datos del IMPEL, 2003). El nuevo modelo de dos fases, genera, además del aceite de oliva, un subproducto sólido constituido por una mezcla de aguas de vegetación, partes sólidas de las aceitunas y restos grasos, denominado alperujo (Figura 1.13). Este residuo tiene un contenido de humedad elevado en el que las especies químicas mayoritarias son solubles. Además, presenta una relación C/N alta y valores de pH comprendidos entre 4 y 6. Respecto a su composición orgánica cabe destacar que es un residuo rico en lignina (32-56%), hemicelulosa (27-42%) y celulosa (14-25%). Asimismo, contiene proteínas (4-11%), lípidos (8-20%) e hidratos de carbono solubles (1-16%) (Albuquerque et al., 2004). También contiene una serie de componentes fitotóxicos, principalmente fenólicos (1-2%), que inhiben el crecimiento microbiano, la germinación y el crecimiento vegetativo en plantas (Capasso et al., 1995; Ramos-Cormenzana et al., 1996; Linares et al., 2003).

Para mejorar las propiedades físico-químicas del alperujo y reducir la cantidad de compuestos fitotóxicos que contiene, este residuo se somete a un proceso de compostaje (Figura 1.13). Dicho proceso consiste en una descomposición aeróbica de la materia orgánica heterogénea por la acción de una mezcla de microorganismos en un ambiente húmedo, templado y aeróbico (Gray et al., 1971) dando lugar a un material llamado compost. Los residuos orgánicos se apilan en cúmulos y, debido a la intensa actividad biológica de las bacterias en la primera fase de la degradación, se

producen reacciones exotérmicas que conducen a temperaturas que alcanzan los 70-80 °C en el interior del montículo y cuyo calor emitido causa la pasteurización de los residuos. La degradación de sustancias orgánicas y la mineralización en CO₂, agua y sales orgánicas suponen una reducción de masa de un 40-50%.

Un residuo orgánico muy novedoso utilizado como enmienda de suelos y que está en alza en los últimos años es el carbón biológico o biochar (BC). Este residuo se forma a partir de la transformación termoquímica de biomasa de diferentes orígenes mediante procesos de pirólisis, gasificación o carbonización hidrotermal, principalmente (Figura 1.13) (Cha et al., 2016). Se obtiene un material con una alta estabilidad al compararlo con otros residuos orgánicos, el cual, al adicionarlo al suelo, aumenta la fertilidad, la retención de agua, el potencial de secuestro de C y reduce las emisiones de gases de efecto invernadero. Además de estas mejoras en las propiedades del suelo asociadas a la optimización de la producción de cultivos, otra finalidad de la adición de este residuo al suelo es la de ayudar a su remediación por contaminación tanto de metales pesados como de contaminantes orgánicos como los plaguicidas, debido a sus propiedades como adsorbente. Para mejorar la capacidad adsorbente del biochar, el producto obtenido de los procesos termales anteriormente descritos puede someterse a técnicas de activación que aumenten su superficie específica y porosidad o para enriquecerlo en determinados grupos funcionales. Los métodos de activación pueden ser de naturaleza física, en la que se utilizan gases como el vapor de agua, el CO₂ o el ozono, o química, basados principalmente en reacciones de oxidación con diferentes oxidantes como permanganato potásico, agua oxigenada, aire u ozono (Tang et al., 2013). Los principales factores que van a condicionar las propiedades del biochar son la temperatura de preparación y el origen del material de partida. Tang et al. (2013) estudiaron algunos ejemplos de la influencia del origen de la biomasa y de la temperatura sobre la superficie específica y porosidad del BC generado y la relacionó con su capacidad de adsorción. Una de las materias primas que pueden ser utilizadas para la obtención de biochar son los residuos de almazaras. Varios trabajos han evaluado la capacidad de adsorción de este tipo de biochar, demostrando su alta capacidad para la adsorción de compuestos orgánicos como los plaguicidas (García-Jaramillo et al., 2014; Gámiz et al., 2016a) y de metales pesados (Ahmad et al., 2014).

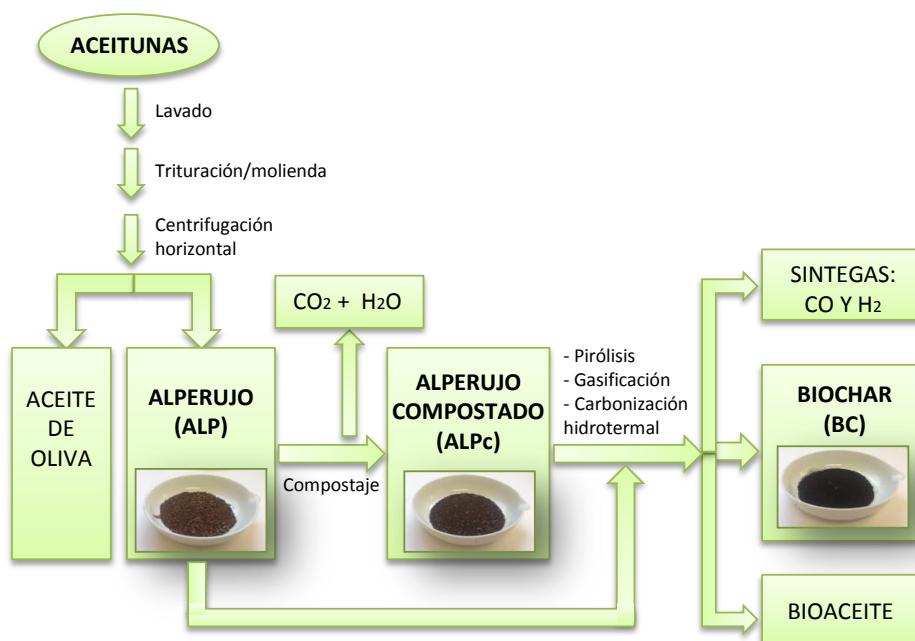


Figura 1.13. Representación esquemática de los procesos de preparación de enmiendas basadas en residuos de almazaras.

1.3.4.2. Efecto de los residuos orgánicos en la dinámica de los plaguicidas

El efecto de los residuos orgánicos sobre la dinámica de los plaguicidas en el suelo dependerá de las propiedades del suelo y del residuo, así como de la naturaleza del plaguicida. Respecto a la adsorción, la materia orgánica insoluble proporcionada por el residuo suele aumentar la adsorción de los plaguicidas al suelo. Sin embargo, las enmiendas orgánicas también aportan al suelo materia orgánica soluble (MOS) cuyo efecto es más variable (Cox et al., 2004; Fernandes et al., 2006). Así, la MOS puede aumentar la adsorción del plaguicida al adsorberse sobre las partículas del suelo y proporcionar nuevos sitios de adsorción o, por el contrario, puede reducir la adsorción por la formación de complejos solubles MOS-plaguicida o por competir con el plaguicida por los sitios de adsorción del suelo (Celis et al., 1998a).

Respecto a la persistencia de los plaguicidas, la adición de residuos orgánicos podría acelerar la degradación de los agroquímicos al proporcionar materia orgánica que favorezca la proliferación microbiana (Barriuso et al., 1997), así como incorporar

nuevos microorganismos exógenos que pudieran contribuir en la degradación de los plaguicidas (Wang et al., 2007b). No obstante, otros autores han observado que el uso de residuos orgánicos como enmiendas también puede ralentizar la degradación de los plaguicidas debido al uso, por parte de los microorganismos degradadores, de la materia orgánica aportada por las enmiendas como alimento más fácilmente degradable que el plaguicida (Albarrán et al., 2003), por el efecto tóxico de ciertos compuestos de la enmienda sobre las especies degradadoras o bien por una disminución de la biodisponibilidad por un aumento de la adsorción.

Hay que resaltar que el efecto será distinto en función del tipo de enmienda orgánica adicionada. Por ejemplo, los tratamientos de compostaje y pirólisis mejoran las propiedades de los residuos haciéndolos más estables y útiles. De este modo, el proceso de compostaje hace que el alperujo reduzca su cantidad de compuestos fitotóxicos y transforma la materia orgánica en compuestos más humificados. Por otro lado, el proceso de transformación térmica para generar biochar da lugar a un residuo muy poroso con gran superficie específica que presenta una alta capacidad de adsorción frente a compuestos orgánicos (Figura 1.14).

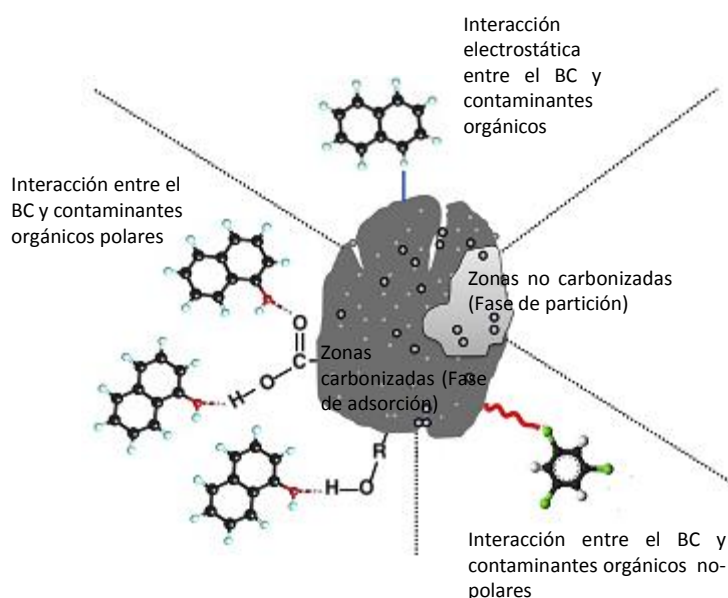


Figura 1.14. Mecanismos de interacción de biochar (BC) con contaminantes orgánicos. Los círculos en las partículas de biochar muestran partición o adsorción (adaptado de Ahmad et al., 2014).

El aumento de la adsorción de los compuestos agroquímicos en suelos enmendados con biochar da lugar a una reducción de su biodisponibilidad en el suelo, lo cual conlleva una menor degradación y una disminución en la absorción por las plantas, que ayuda a reducir la presencia de plaguicida residual en los cultivos. Sin embargo, puesto que se requiere que el plaguicida esté biodisponible para actuar contra la plaga objetivo, la disminución de la efectividad del plaguicida por el efecto del BC no es completamente deseable (Tang et al., 2013). Por consiguiente, el uso de biochar en la agricultura requiere realizar un balance entre el potencial efecto del residuo en la remediación de plaguicidas y su efecto negativo en la eficacia del mismo. Cabe destacar que estudios recientes han encontrado que el envejecimiento del biochar puede reducir su capacidad de adsorción con el tiempo, lo cual mejoraría la eficiencia del uso de biochar en suelos agrícolas (Martin et al., 2012).

El estudio del efecto de los residuos orgánicos en la enantioselectividad de la adsorción y degradación de plaguicidas quirales ha sido escasamente estudiado. En un principio, el efecto sobre los procesos abióticos afectaría de igual modo a ambos enantiómeros. Sin embargo, los procesos biológicos, es decir, aquellos que son realizados por microorganismos o enzimas extracelulares, sí que podrían verse afectados de forma diferente para cada uno de los enantiómeros. Esto se debe a que los residuos orgánicos podrían suministrar al suelo microorganismos exógenos que degradarían exclusivamente a uno de los enantiómeros o bien suministrar algún tipo de compuesto tóxico que afectara a los microorganismos degradadores de un enantiómero específico, disminuyendo su velocidad de degradación (Gámiz et al., 2013, 2016a; Romero et al., 2001). De este modo, Gámiz et al. (2013) observaron que la aplicación de un residuo de almazara fresco a un suelo franco-arcilloso daba lugar a un aumento de la velocidad de degradación del enantiómero *S* del fungicida metalaxil y a una disminución en la velocidad de degradación del enantiómero *R*, en comparación con el suelo sin enmendar. En otro estudio, Gámiz et al. (2016a) observaron este mismo comportamiento al aplicar alperujo compostado, mientras que al aplicar biochar obtenido a partir del mismo la persistencia de ambos enantiómeros aumentó debido a la alta capacidad de adsorción del BC para el fungicida.

La enmienda de suelos con residuos orgánicos no sólo modifica la velocidad de degradación de los enantiómeros, sino que además puede cambiar la

enantioselectividad del proceso. Así, Romero et al. (2001) encontraron que la degradación del enantiómero *S* de los herbicidas mecoprop y diclorprop en un suelo franco-arcilloso era más rápida que la del enantiómero *R*. Al adicionar a dicho suelo residuos procedentes de turba, la enantioselectividad de la disipación cambió, pasando el enantiómero *S* a ser más persistente que el *R*.

1.3.5. Aplicación de materiales arcillosos

Las arcillas, por su elevado poder adsorbente, constituyen un grupo de materiales de origen natural que han sido propuestos en diversas aplicaciones dirigidas a prevenir o remediar la contaminación por los plaguicidas que se usan en la agricultura. Dichas aplicaciones incluyen desde su uso como soportes para una liberación controlada del producto fitosanitario hasta su aplicación directa al suelo para la inmovilización del plaguicida o su uso como componentes de filtros para la descontaminación de aguas afectadas por la presencia de plaguicidas. A continuación se describen brevemente, las características estructurales y propiedades adsorbentes de este tipo de materiales, así como sus principales aplicaciones en la prevención y remediación de la contaminación por plaguicidas.

1.3.5.1. Propiedades estructurales y adsorbentes de las arcillas

Los materiales arcillosos pueden definirse como un variado grupo de compuestos de diferente naturaleza y propiedades que tienen en común una estructura constituida por láminas formadas por la unión de tetraedros y/u octaedros de óxidos o hidróxidos metálicos. En función de los metales presentes en la estructura y de la constitución de las láminas, se obtiene una extensa variedad de compuestos que pueden dividirse, considerando la carga permanente de estas láminas, como arcillas catiónicas (filosilicatos o arcillas naturales) o arcillas aniónicas (hidrotalcitas o hidróxidos dobles laminares) (Figura 1.15).

La estructura laminar de estos materiales es la responsable de su alta superficie específica y de la existencia de un espacio interlaminar, generalmente expansible, capaz de albergar compuesto orgánicos. Además, presentan la posibilidad de modificar su naturaleza superficial (hidrofílica, hidrofóbica...) para aumentar su

afinidad por un adsorbato específico. Por todo ello, las arcillas han sido propuestas como adsorbentes de plaguicidas.

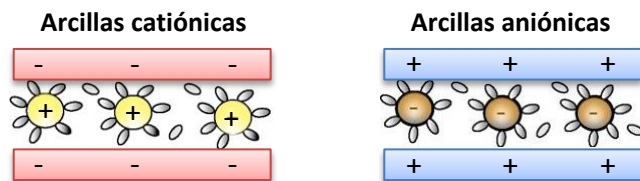


Figura 1.15. Representación esquemáticas de la estructura de las arcillas catiónicas y aniónicas.

1.3.5.1.1. Arcillas catiónicas

a) Estructura

El término arcillas catiónicas se usa para designar a aquellos minerales de la arcilla presentes en suelos y sedimentos los cuales son productos finales de la meteorización de los silicatos o se encuentran en yacimientos enriquecidos en algunos de ellos. Estos constituyentes de los suelos tienen una gran importancia en la agricultura, ya que influyen en propiedades clave de los suelos como la estructura, textura, retención de agua y fertilidad, entre otras. La mayoría de estos minerales pertenecen al grupo de los filosilicatos, aunque pueden coexistir con algunas otras fases minerales cristalinas o amorfas (óxidos e hidróxidos: gibbsita, hematites, etc...) que también se incluyen en la definición de minerales de la arcilla (Guggenheim & Martin, 1995). En este apartado nos centraremos en el grupo de los filosilicatos y más específicamente en el grupo de las esmectitas, al ser las arcillas catiónicas que se utilizarán y modificarán en el desarrollo de esta tesis.

Los filosilicatos están formados a partir del apilamiento de láminas tridimensionales, constituidas a su vez por capas bidimensionales de unidades tetraédricas de Si-O y unidades octaédricas de Al-(O-OH) o Mg-(O-OH). En función del apilamiento se diferencian tres tipos de minerales:

Minerales tipo 1:1

En ellos, cada lámina tridimensional se forma por la condensación de una capa tetraédrica y otra octaédrica. Dichas láminas se unen entre sí a través de puentes de hidrógeno OH-O de capas adyacentes.

Minerales tipo 2:1

Las lámina tridimensionales están constituida por una capa octaédrica situada entre dos capas tetraédricas, de modo que la unión entre láminas tiene lugar mediante fuerzas de van der Waals entre átomos de O de capas contiguas. En la mayoría de los casos, las láminas de los filosilicatos 2:1 presentan una carga negativa permanente debido a sustituciones isomórficas de cationes Si^{4+} de las capas tetraédricas por otros cationes de tamaño parecido pero de carga menor como el Al^{3+} . También son posibles sustituciones isomórficas en las capas octaédricas de, por ejemplo, Al^{3+} por Mg^{2+} . La carga negativa generada está compensada por cationes inorgánicos, hidratados en mayor o menor grado, que se sitúan tanto entre las láminas del material como en los bordes. Estos cationes inorgánicos pueden ser intercambiables por otros, lo cual dependerá de que la carga permanente se dé en la capa tetraédrica u octaédrica, de la carga por superficie laminar o de celda, así como de la naturaleza del catión.

Minerales tipo 2:1:1

Este tipo de minerales presentan una estructura similar a la de los minerales del tipo 2:1, en los que el balance de carga se mantiene por la presencia, en el espacio interlaminar, de grupos hidroxilos coordinados octaédricamente similares a las capas octaédricas. Esto supone que tanto su capacidad de intercambio catiónico como de hinchamiento son prácticamente nulas (Karathanasis et al., 1983; Ezzaim et al., 1999). A este tipo de minerales pertenecen las cloritas.

En este trabajo, nos referiremos específicamente a los filosilicatos del tipo 2:1, del grupo esmectitas y subgrupo montmorillonita, los cuales son minerales dioctaédricos (las posiciones octaédricas están ocupadas por Al) de fórmula genérica $(\text{Na,Ca})_{0.3}(\text{Al, Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$.

b) Interacciones de plaguicidas con esmectitas

Los centros activos de las esmectitas para la adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos se muestran en la Figura 1.16. Dichos centros son, principalmente, los cationes de cambio hidratados de la interlámina y los bordes del mineral, los grupos silanoles y aluminolos de los bordes de ruptura de los enlaces Si-O-Si y Al-O-Si, los cuales son sitios de carga variable dependiente del pH, y los grupos siloxanos laminares de los planos basales externos o interlaminares comprendidos entre los sitios cargados, que presentan carácter hidrofóbico (Jaynes & Boyd, 1991a).

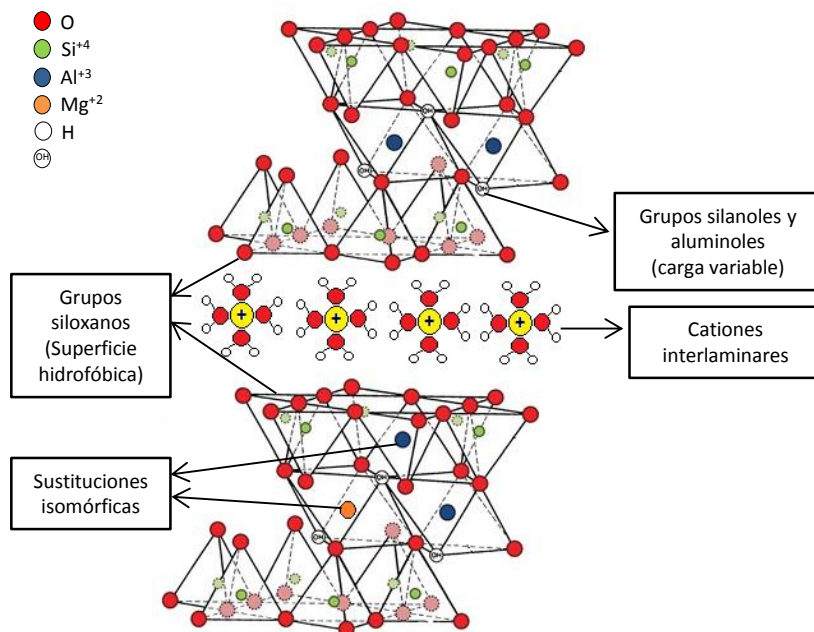


Figura 1.16. Centros activos de un mineral esmectítico en relación con la adsorción de plaguicidas.

Los mecanismos de interacción de estas arcillas con los plaguicidas dependen, en gran medida, de la carga de dichos plaguicidas. De este modo, los plaguicidas catiónicos y protonables se adsorben rápidamente por su afinidad por la carga negativa de las láminas (Hermosín & Pérez-Rodríguez, 1981; Cox et al., 1997b) por procesos de intercambio catiónico y a través de enlaces polares y de hidrógeno. Por otro lado, los plaguicidas aniónicos y los ácidos débiles presentan una adsorción muy baja o nula debido a que son repelidos por las superficies basales cargadas negativamente (Celis et al., 1999a). Cabe señalar que en las esmectitas existen sitios

de adsorción para especies aniónicas, como son los bordes cargados positivamente (si el pH es inferior a 5), los metales polivalentes en los sitios de intercambio o, con las condiciones apropiadas, mediante la dominancia de la atracción por fuerzas de van der Waals (Lagaly, 2001); sin embargo, no son muy numerosos y globalmente predominan los sitios con cargas negativas. Finalmente, los plaguicidas neutros hidrófobos no presentan, en general, una alta afinidad por las esmectitas debido al ambiente hidrofílico de la superficie del mineral generado por los cationes interlaminares hidratados (Jaynes & Vance, 1996), mientras que los plaguicidas neutros que presentan grupos funcionales polares (-OH, =O, -NH₂, -NO₂) son retenidos mediante fuerzas electrostáticas (ion-dipolo o dipolo-dipolo) o enlaces de coordinación.

c) Interacciones de plaguicidas con esmectitas modificadas con cationes orgánicos

Con el fin de mejorar las propiedades de adsorción de las arcillas tipo esmectitas frente a compuestos aniónicos y ácidos débiles, así como frente a compuestos neutros hidrofóbicos o polares, es posible la modificación de las propiedades superficiales de estas arcillas mediante la sustitución de los cationes inorgánicos presentes en el espacio interlaminar por cationes orgánicos (Jaynes & Boyd, 1991a; Hermosín & Cornejo, 1992; Lagaly, 2001). Estas transformaciones son posibles gracias a que las esmectitas son filosilicatos de tipo expansibles y permiten la incorporación en la interlámina de compuestos orgánicos voluminosos para formar organo-arcillas. Los mecanismos por los que los cationes orgánicos se introducen en el espacio interlaminar pueden ser de diferente naturaleza, siendo los principales a través de reacciones de intercambio catiónico y por adsorción física.

Los cationes orgánicos más comunes que se utilizan para la preparación de las organo-arcillas son los cationes aquilamonio cuaternarios de fórmula general $[(CH_3)_nNR_{4-n}]$, donde R es un hidrocarburo aromático o alifático (Figura 1.17) (Carrizosa et al., 2001), aunque también se emplean otros compuestos como polímeros (Darder et al., 2003; Gámiz et al., 2010; Celis et al., 2012).

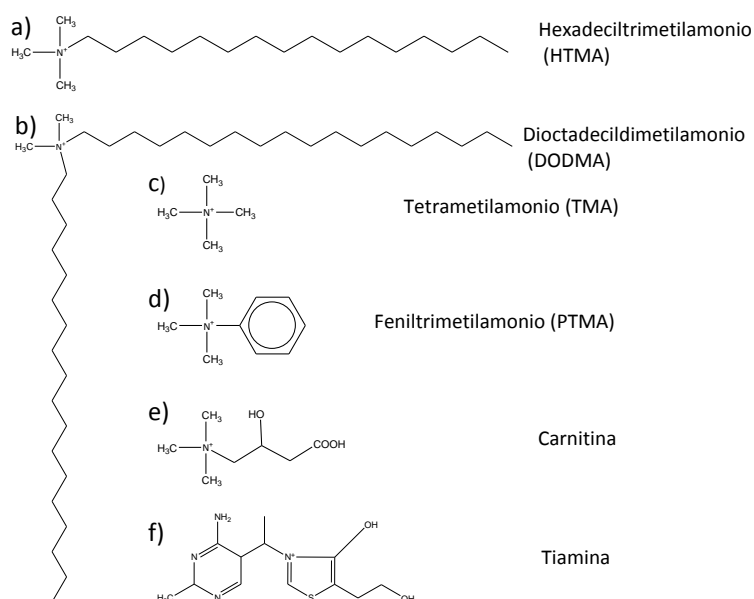


Figura 1.17. Ejemplos de cationes tipo aquilamonio cuaternarios utilizados en la modificación de arcillas catiónicas.

El grado de adsorción de los plaguicidas en las organo-arcillas depende, en parte, del espacio interlaminar disponible para albergar estas moléculas. Dicho espacio será más o menos amplio en función del tamaño, la cantidad y la disposición de los cationes orgánicos en la interlámina. Así, dependiendo del tamaño del catión interlaminar, las organo-arcillas se pueden dividir en dos grupos:

- *Organo-arcillas organofílicas:* son aquellas que han incorporado en su espacio interlaminar cationes de gran tamaño, tales como el hexadecyltrimetilamonio (Figura 1.17a), octadecylamonio y dioctadecildimetilamonio (Figura 1.17b). Estos cationes orgánicos se anclan a la superficie de la arcilla interaccionando entre sí generando un ambiente hidrofóbico que actúa como un medio de partición para compuestos orgánicos no iónicos y elimina eficazmente tales compuestos del agua (Jaynes & Vance, 1996). De este modo, la modificación de la arcilla aumenta la afinidad por plaguicidas neutros (Aguer et al., 2000) e incluso por plaguicidas ácidos (Celis et al., 1999a; Carrizosa et al., 2001). La amplitud del espacio interlaminar dependerá de la disposición de los cationes en la interlámina, la cual será diferente en función de la carga laminar superficial del mineral de la arcilla y del tamaño de las cadenas de hidrocarburos, pudiéndose dar, como se muestra en la Figura 1.18a, la

configuraciones de monocapa, bicapa, pseudoditrimolecular o parafínica (Lagaly, 1982; Jaynes & Vance, 1996).

- *Organo-arcillas adsortivas*: son aquellas formadas a partir de la incorporación de pequeños cationes amonio cuaternarios, tales como el tetrametilamonio (Figura 1.17c), los cuales existen como especies discretas en la superficie del mineral de la arcilla sin generar una fase de partición orgánica. De este modo, como se expone en la Figura 1.18b, los cationes orgánicos actúan como pilares no hidratados que expanden las láminas haciendo más accesible la abundante área superficial de siloxanos (Brixie & Boyd, 1994).

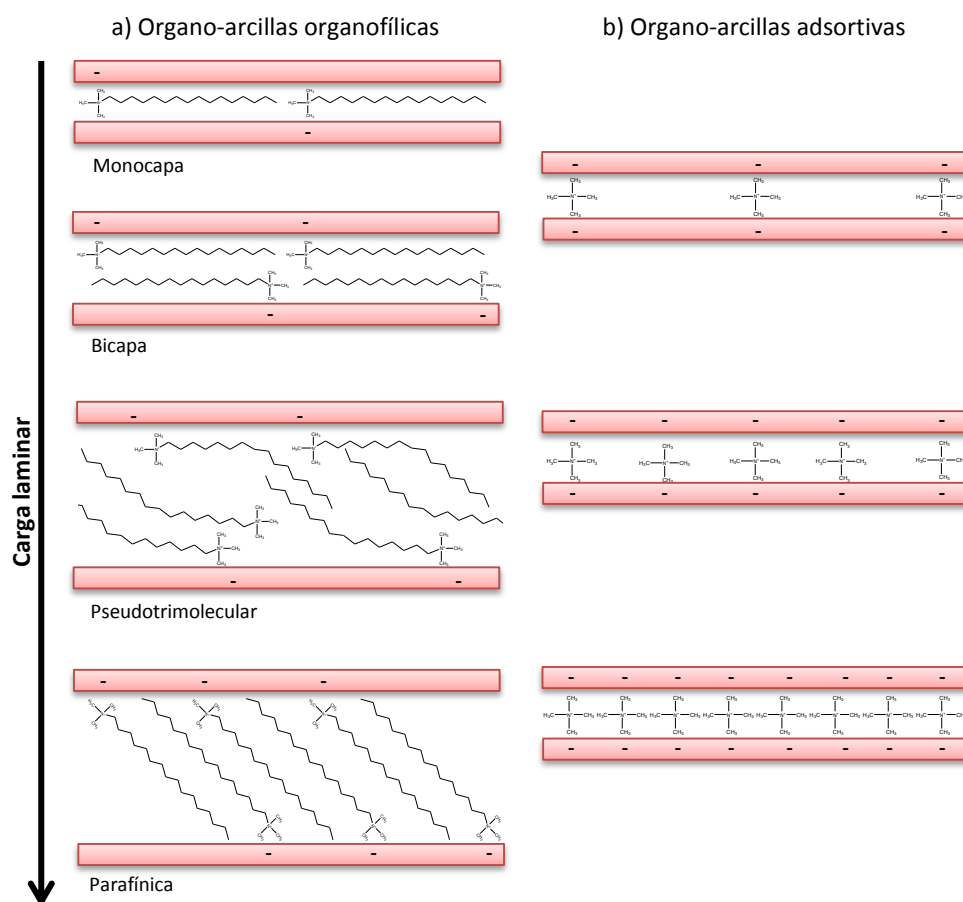


Figura 1.18. Ejemplos de las posibles disposiciones de cationes orgánicos en la interlámina de arcillas catiónicas en función de su tamaño y de la carga de las láminas.

Con el objeto de obtener organo-arcillas que presenten una alta afinidad por pesticidas específicos, es posible la modificación de la interlámina con cationes orgánicos funcionalizados que contengan grupos funcionales apropiados para generar un microambiente interlaminar con una alta afinidad por estos plaguicidas concretos. Cruz-Guzmán et al. (2004, 2005) sintetizaron organo-arcillas utilizando los cationes L-carnitina (Figura 1.17e), éster dimetílico de la L-cisteína y tiamina (Figura 1.17f) como cationes modificadores. Se observó que la capacidad adsorbente de las muestras de organo-arcilla frente al herbicida simazina era dependiente de la naturaleza del catión introducido, lo que se atribuyó a diferentes efectos de funcionalidad y efectos estéricos de cada uno de los cationes (Cruz-Guzmán et al., 2004).

1.3.5.1.2. Arcillas aniónicas

a) Estructura

Las arcillas aniónicas, también conocidas como hidróxidos dobles laminares y compuestos tipo hidrotalcita (HT), son sólidos cristalinos constituidos por capas de hidróxidos metálicos tipo brucita en las que se dan sustituciones isomórficas en los centros octaédricos de metales divalentes por metales trivalentes. Estas sustituciones generan una carga positiva permanente en las capas de hidróxidos, la cual es compensada por aniones inorgánicos que se sitúan en el espacio interlaminar (Figura 1.19). Estos compuestos pueden formularse como $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x (OH)_2] A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O$ donde $M^{II} = Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} \dots$; $M^{III} = Al^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+} \dots$; $A^{n-} = CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, Cl^-, NO_3^- \dots$ y x varía entre 0.22 y 0.33 (Cavani et al., 1991). La hidrotalcita de origen natural se compone de capas de $Mg(OH)_2$ con sustituciones de Mg^{2+} por Al^{3+} neutralizadas por iones carbonato, dando $[Mg_6 Al_2 (OH)_{16}]CO_3 \cdot 4H_2O$. Estas arcillas aniónicas no son tan comunes en la naturaleza como las catiónicas; sin embargo, el hecho de que sean baratas y fáciles de sintetizar hacen que resulten atractivas para la industria.

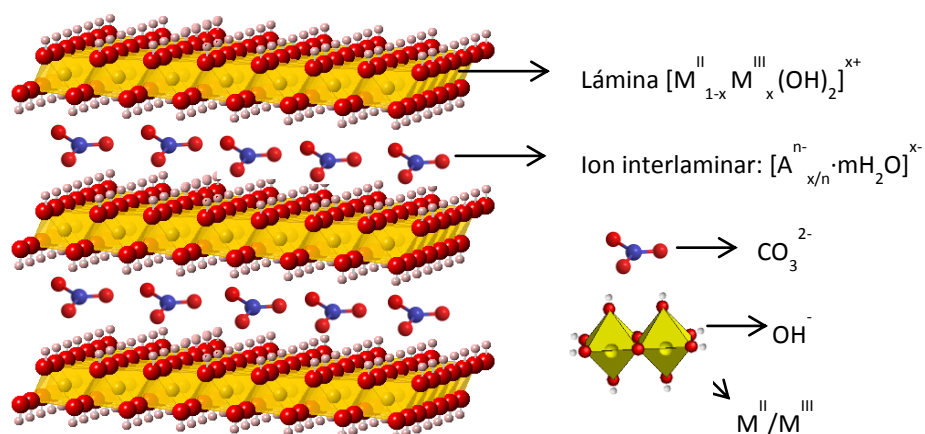


Figura 1.19. Estructura laminar de las hidrotalcitas con CO_3^{2-} intercalados.

b) Interacción de plaguicidas con hidrotalcitas

Las características estructurales de las hidrotalcitas, en particular la presencia de cargas positivas permanentes en las láminas, hacen que sean óptimas para la adsorción de compuestos aniónicos. Sin embargo, la capacidad de adsorción de las hidrotalcitas para moléculas no-iónicas, hidrofóbicas y de baja polaridad es muy pobre. Para mejorar su capacidad adsorbente, estos sólidos pueden someterse a diferentes procedimientos físicos o químicos, tales como tratamientos ácidos o básicos, tratamientos termales, pilareado, reacciones de inserción y reacciones de intercambio iónico. De esta forma, se obtiene un material que presenta las siguientes propiedades (Cavani et al., 1991; Del Hoyo, 2007; Cornejo et al., 2008):

- Elevada superficie específica ($100-300 \text{ m}^2/\text{g}$).
- Presentan “Efecto memoria”.
- Distribución homogénea de los iones metálicos en los productos de la calcinación.
- Propiedades ácido-base variables en función de la presencia de los diferentes metales de la lámina.
- Alta capacidad de intercambio aniónico.

Las propiedades anteriormente mencionadas son las responsables de que las hidrotalcitas sean buenos adsorbentes de compuestos aniónicos orgánicos como

ciertos plaguicidas. La capacidad de adsorción de estos materiales es directamente proporcional a la carga de la lámina del mineral y depende en gran medida, de la naturaleza y la facilidad de reemplazo de los aniones interlaminares (Figura 1.20a). Así, los aniones inorgánicos monovalentes son más fácilmente intercambiables que los divalentes, siendo el orden de selectividad de adsorción para la HT para diferentes aniones: $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ (Miyata, 1983).

Ante la dificultad, en ciertos casos, de desplazar los aniones CO_3^{2-} por otros aniones de carácter orgánico, se puede utilizar un procedimiento alternativo de adsorción de dichos aniones denominado *método de reconstrucción*. Este método consiste en la calcinación de la hidrotalcita carbonatada a 500 °C, obteniéndose un óxido mixto amorfo, para posteriormente llevar a cabo la hidratación del óxido obtenido con una disolución acuosa del anión que queremos introducir en la interlámina. Este procedimiento es posible gracias al “efecto memoria” que presentan las hidrotalcitas por el cual, tras hidratar el óxido obtenido de la calcinación, se recupera la estructura de hidróxido doble laminar albergando el anión que se quería adsorber (Reichle, 1986; Chibwe & Jones, 1989) (Figura 1.20b). Tras la adsorción de los compuestos orgánicos, las hidrotalcitas pueden ser recicladas por pirólisis o combustión del anión adsorbido a través de sucesivos ciclos de calcinación-hidratación (Ulibarri et al., 1995). Un ejemplo de la mejora de la adsorción mediante el proceso de reconstrucción fue evaluado por Celis et al. (1999a). En este estudio se observó que la adsorción del herbicida imazamox en una hidrotalcita carbonatada fue muy baja debido a la dificultad de desplazar al anión carbonato por el imazamox en su forma aniónica monovalente ($\text{pH} > 6$). Sin embargo, la adsorción del herbicida sobre la hidrotalcita calcinada fue muy alta debido a la gran afinidad del anión imazamox ($\text{pH} > 6$) por las láminas cargadas positivamente en ausencia de iones carbonatos. El método de reconstrucción es también muy útil para la adsorción de plaguicidas ácidos y otros compuestos aniónicos en ambientes acuáticos, ya que la alta abundancia de iones carbonatos en las aguas naturales dificulta la sustitución de este anión por los contaminantes aniónicos en las hidrotalcitas carbonatadas (Hermosín & Cornejo, 1992).

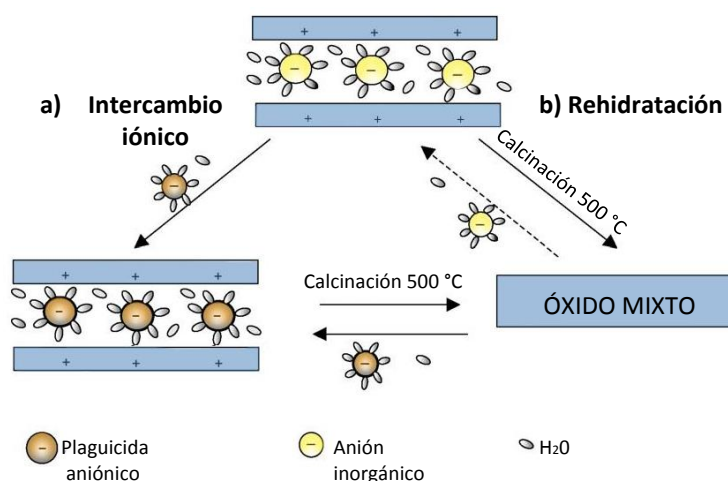


Figura 1.20. Esquemas de los mecanismos de adsorción de plaguicidas aniónicos en hidrotalcitas por el método de intercambio iónico (a) y por rehidratación (b) (Cornejo et al., 2008).

c) Interacciones de plaguicidas con hidrotalcitas modificadas con aniones orgánicos

Para aumentar la afinidad de las hidrotalcitas por los plaguicidas no-iónicos, se lleva a cabo la modificación de la naturaleza de la superficie del material de hidrofílica a hidrofóbica mediante la intercalación de aniones orgánicos en la interlámina. Dicha intercalación puede realizarse por síntesis directa o mediante el proceso de reconstrucción anteriormente descrito. Los principales aniones intercalados son los surfactantes dodecilsulfato (DDS) (Figura 1.21a) y dodecilbencenosulfonato (DBS) (Figura 1.20b). Sin embargo, en los últimos años, algunos autores han presentado la versatilidad de otros aniones, como los derivados de los ácidos carboxílicos: elaidato, oleato, linoleato y linolenato (Figura 1.21c-f respectivamente) (Xu et al., 2004; Celis et al., 2014).

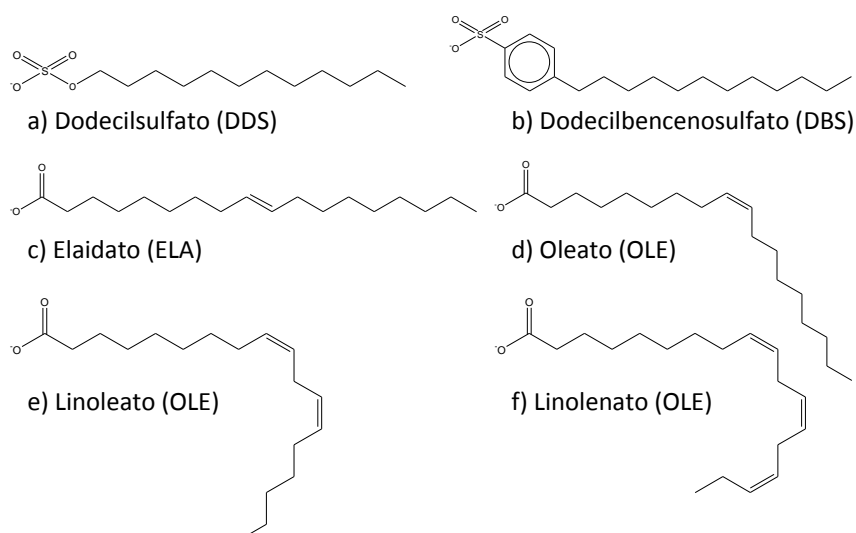


Figura 1.21. Algunos surfactantes y aniones carboxilatos usados para modificar el carácter hidrofílico a hidrofóbico en las hidrotalcitas.

Los principales factores de los que va a depender el grado de adsorción de los plaguicidas en las organo-hidrotalcitas serán la naturaleza, la cantidad y la configuración estructural que adopte el anión orgánico intercalado. Celis et al. (2014) evaluó la capacidad de adsorción de muestras de hidrotalcitas y organo-hidrotalcitas obtenidas a partir de la incorporación de aniones de ácidos grasos de igual tamaño (18 átomos de carbono) pero diferente número de insaturaciones. Para el caso de los plaguicidas no-iónicos el resultado fue una baja adsorción en la hidrotalcita inalterada debido a su carácter hidrofílico y una gran afinidad por las organo-hidrotalcitas, al cambiar la naturaleza de la arcilla a hidrofóbica por la incorporación de los aniones orgánicos. La capacidad de adsorción de las organo-hidrotalcitas dependió del grado y tipo de insaturaciones. Así, la muestra de hidrotalcita modificada con el anión elaidato, que presenta una insaturación en *trans*, mostró mayor adsorción de los plaguicidas no-iónicos al compararlo con aquellas modificadas con aniones con insaturaciones en *cis*. Por otro lado, cuanto mayor era el número de insaturaciones en *cis* de los aniones orgánicos, menor fue la capacidad de adsorción para los plaguicidas no-iónicos. Esto se debió a que la curvatura impuesta por la geometría *cis* de los dobles enlaces da lugar a estructuras de menor densidad de empaquetamiento

reduciéndose el espaciado interlaminar donde albergar los compuestos orgánicos adsorbidos.

Un caso similar se observó en la adsorción del insecticida clorpirifos sobre muestras de hidrotalcitas modificadas con dodecilsulfato (HT-DDS) y dodecylbencenosulfato (HT-DBS). Se demostró que la presencia del anillo bencénico en el anión de DBS daba lugar a una densidad de empaquetamiento menor a la que se daba en el caso del DDS, donde la cadena alifática es lineal. La mayor densidad del empaquetamiento de los aniones orgánicos DDS explicaba la mayor adsorción del insecticida en la muestra de HT-DDS en comparación con la muestra de HT-DBS. (Wang et al., 2005).

1.3.5.2. Aplicaciones de las arcillas como adsorbentes de plaguicidas

1.3.5.2.1. Barreras inmovilizadoras de plaguicidas en suelos

Este uso propuesto para las arcillas consiste en la formación de barreras que inmovilizan a los contaminantes en la zona más superficial de los suelos, impidiendo que se produzcan pérdidas por escorrentía o lixiviación. Esta disminución de las pérdidas por escorrentía y lixiviación reducen el riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas y, por otra parte, puede incrementar la eficacia del plaguicida al prolongar su tiempo de residencia en la rizosfera. En general, los contaminantes pueden unirse a este tipo de barreras modificando su fase (barreras de precipitación) o bien adherirse a la superficie de los materiales que forman la barrera (barrera de adsorción) (Morrison & Spangler, 1993).

La efectividad del uso de organo-arcillas procedentes de arcillas catiónicas como barreras para adsorber los plaguicidas ha sido expuesta en multitud de estudios (Jaynes & Boyd, 1991b; Brixie & Boyd, 1994; Rodríguez-Cruz et al., 2007). Voudrias (2002) demostró, mediante modelos predictivos, que el tratamiento de un suelo con bentonita modificada con HDTMA disminuyó la lixiviación del herbicida diurón y de benceno. Por otro lado, Rodríguez-Cruz et al. (2007) emplearon barreras constituidas por diferentes minerales de la arcilla (montmorillonita, caolinita paligorskita) modificados con octadeciltrimetilamonio (ODTMA) en estudios de lixiviación en columnas de suelo, observándose una reducción de la lixiviación de varios plaguicidas e incluso, la inmovilización de algunos de ellos.

El empleo de organo-hidrotalcitas para la formación de barreras inmovilizadoras no se ha estudiado tan extensamente como en el caso de las organo-arcillas catiónicas. No obstante, recientemente se ha propuesto su uso como adsorbentes para la retención de contaminantes en sistemas suelo-agua. Un ejemplo es el estudio realizado por Bruna et al. (2012) en el que se evaluó el uso de HT-DDS para la inmovilización de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1.3.5.2.2. Soportes para la liberación controlada de plaguicidas

En la mayoría de las formulaciones de plaguicidas que se comercializan actualmente, el principio activo se presenta en una forma inmediatamente disponible para actuar sobre la plaga objetivo. Esto conlleva que, en los casos de plaguicidas muy solubles, estos se pierdan rápidamente por procesos de lixiviación y/o escorrentía tras su aplicación, ya que las moléculas no permanecen en el suelo el tiempo suficiente para que se difundan a través de los agregados y alcancen los sitios de adsorción presentes en los mismos (Gish et al., 1991; Cox et al., 2000a). Para reducir las pérdidas de plaguicidas por transporte, se ha propuesto la síntesis de complejos o formulaciones de liberación controlada en las cuales solo una pequeña parte del plaguicida se encuentra en una forma inmediatamente disponible, mientras que la mayor parte se encuentra adsorbida en un soporte inerte, en este caso arcillas u organo-arcillas, que lo libera gradualmente con el tiempo (Fernandez-Pérez et al., 1998; Celis et al., 2000, 2002a; Undabeytia et al., 2003). El uso de este tipo de formulaciones de plaguicidas presenta muchas ventajas. Por un lado, la reducción de las pérdidas por escorrentía y lixiviación permite una disminución en la dosis de aplicación y en el número de aplicaciones del plaguicida requeridas si se compara con las formulaciones convencionales, lo cual supone, a su vez, un abaratamiento de los costes. Además, se da un aumento en la seguridad de la manipulación del agroquímico por parte de los agricultores y, en general, un descenso en los efectos perjudiciales sobre el medio ambiente al reducirse la posible contaminación difusa (Gerst et al., 1998a). No obstante, el uso de estas formulaciones presenta el inconveniente de que ciertos complejos arcilla-plaguicida mantienen altas cantidades del agroquímico no liberado, lo que puede dar lugar a problemas de contaminación a largo plazo y la necesidad de mayores dosis de aplicación (Celis et al., 2002b; Cornejo

et al., 2004). Otra desventaja de su uso es el elevado precio actual en el mercado de estas formulaciones.

En el caso de las arcillas catiónicas, se han ensayado diferentes tipos de formulaciones, principalmente basadas en arcillas modificadas con cationes alquilamonio (Carrizosa et al., 2000, 2001; Undabeytia et al., 2000; Lagaly., 2001; Celis et al., 2002a). Sin embargo, los estudios más recientes se han centrado en la síntesis de complejos de plaguicidas soportados sobre arcillas modificadas con cationes orgánicos naturales, los cuales causarían menos daños medioambientales una vez introducidos en ecosistemas naturales. Algunos ejemplos serían las formulaciones de diurón soportado en una montmorillonita modificada con espermina (Trigo et al., 2009), así como este mismo herbicida sobre una montmorillonita modificada con fosfatidilcolina (Undabeytia et al., 2012).

Por otro lado, los estudios acerca del empleo de hidrotalcitas y organo-hidrotalcitas como soportes para plaguicidas son mucho menos comunes que en el caso de las organo-arcillas de arcillas catiónicas, si bien en las últimas décadas el interés por este tipo de formulaciones y los estudios sobre ellos han ido en aumento (Meng et al., 2005; Cardoso et al., 2006; Bruna et al., 2008; Qiu et al., 2009; Chaara et al., 2011). Un ejemplo es el estudio realizado por Cardoso et al. (2006), en el cual se sintetizaron complejos hidrotalcita-plaguicidas con tres herbicidas ácidos diferentes: 2,4 D, MCPA y picloram y se aplicaron a columnas de suelo para simular el proceso de lixiviación. Para los tres plaguicidas, se observó un retraso en la lixiviación al ser aplicados en forma de complejos en lugar de libres. En otros trabajos se han utilizado organo-hidrotalcitas para formar complejos de plaguicidas no-iónicos. Así, Bruna et al. (2008) sintetizaron complejos de terbutilazina soportada sobre hidrotalcitas modificadas con los aniones orgánicos dodecilsulfato (DDS) y sebacato (SEB) y se detectó de nuevo un retardo en la lixiviación del herbicida cuando se aplicaba en forma de complejo al compararlo con la formulación comercial. Resultados similares fueron obtenidos por Celis et al. (2015b) al aplicar formulaciones de metalaxil soportado en organo-hidrotalcitas que habían sido modificadas con aniones de ácidos grasos.

1.3.5.2.3. Filtros para la depuración de aguas

Una aplicación muy importante de las arcillas y organo-arcillas tanto catiónicas como aniónicas, es su posible uso como filtros para la depuración de aguas y para la remediación de medios acuáticos contaminados.

El empleo de esmectitas tanto inalteradas como modificadas con cationes orgánicos en la remediación de sistemas acuáticos contaminados por plaguicidas ha sido ampliamente estudiado. Se ha evaluado el uso de estos materiales como filtros de compuestos orgánicos tanto iónicos como polares (Hermosín & Cornejo, 1992; Sánchez-Camazano et al., 1995; Cox et al., 1997b; Celis et al., 1999 a,b; Ganigar et al., 2010), así como de compuestos neutros no polares (Lee et al., 1990; Sheng & Boyd, 2000; Chun et al., 2003; Shen, 2004).

A pesar de la alta afinidad de las hidrotalcitas por plaguicidas aniónicos, el uso de estas arcillas como filtros en aguas naturales no resulta efectivo debido a que la abundancia de iones carbonatos en este medio dificulta su desplazamiento por el plaguicida que se quiere retirar. Por ello, es necesario modificar la estructura de la interlámina para mejorar la afinidad por dichos plaguicidas. Una posible estrategia para mejorar la adsorción consistiría en intercalar en la hidrotalcita aniones monovalentes fácilmente intercambiables como el Cl^- o el NO_3^- o bien utilizar hidrotalcitas calcinadas a 500 °C. Un ejemplo sería la retirada del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) de una disolución acuosa. Hermosín & Cornejo (1992) encontraron que aunque una hidrotalcita de Ni/Al carbonatada era más eficiente para retirar 2,4-D de aguas que varias arcillas naturales y organo-arcillas, la adsorción se limitaba principalmente a la superficie externa del hidróxido doble laminar, ya que el anión monovalente 2,4-D no era capaz de desplazar a los aniones divalentes carbonatos de la interlámina. Para mejorar la adsorción de este herbicida sobre una muestra de hidrotalcita Zn/Al, Lakramimii et al. (2000) introdujeron aniones inorgánicos monovalentes de Cl^- , los cuales son más fácilmente intercambiables por el 2,4-D. Otra solución para aumentar la afinidad de las hidrotalcitas por este herbicida aniónico es la utilización de su variante calcinada a 500 °C, haciendo uso del “efecto memoria” (Pavlovic et al., 2005). Otros plaguicidas aniónicos que han sido retirados satisfactoriamente de aguas naturales mediante hidrotalcitas son los fenolatos, los cuales suelen encontrarse en aguas subterráneas. Se pueden citar como ejemplo el 2,4,6-triclorofenol (TCP) o el 2,4,6-trinitrofenol (TNP) (Hermosín et al., 1993, 1996;

Ulibarri et al., 1995), 2,4-dinitrofenol (DNP) y 2-metil-4,6-dinitrofenol (Chaara et al., 2010). Otros contaminantes orgánicos presentes en aguas y que son aptos para ser retenidos por hidrotalcitas son los surfactantes como el dodecildibenzosulfato, octilsulfato o el 4-octilbenzenosulfonato (Pavlovic et al., 1997; You et al., 2002), moléculas derivadas de ácidos orgánicos (Crepaldi et al., 2002; Cardoso et al., 2003) y tintes sintéticos (Orthman et al., 2003).

Además de para contaminantes aniónicos orgánicos, las hidrotalcitas y sus productos de calcinación han sido evaluados como adsorbentes de contaminantes inorgánicos aniónicos de diferente naturaleza, como nitratos y fosfatos responsables de la eutrofización en aguas naturales (Shin et al., 1996; Legrouri et al., 1999; Gillman, 2010), iones con actividad radioactiva de aguas residuales (Kang et al., 1996; Toraishi et al., 2002), oxoaniones como arseniato, cromato y vanadato (Kovanda et al., 1999), aniones monoatómicos como Cl^- procedentes de aguas ácidas (Kameda et al., 2000), etc.

Cabe destacar que la práctica totalidad de los estudios realizados sobre la aplicación de arcillas catiónicas y aniónicas como enmiendas, filtros y soportes de plaguicidas no han abordado el posible efecto enantioselectivo que pudiera darse por la presencia de átomos quirales en la estructura del plaguicida, habiéndose analizado y tratado estos compuestos como una suma de enantiómeros y no como enantiómeros individuales.

2. OBJETIVOS



El hecho de que más de un cuarto de los plaguicidas comercializados en la actualidad a nivel mundial sean quirales ha suscitado un gran interés por la particular actividad de este grupo de compuestos agroquímicos y por las consecuencias de su presencia en compartimentos ambientales como suelos, aguas y sedimentos. Los plaguicidas quirales se caracterizan por presentar al menos dos formas enantioméricas (imágenes especulares no superponibles) asociadas a la presencia de un centro estereogénico en su estructura, las cuales, tradicionalmente, se han venido utilizando, regulando y analizando de forma conjunta considerándolas como si fueran indistinguibles. Sin embargo, el avance en el desarrollo de métodos de separación y análisis enantioselectivos de los últimos años ha permitido demostrar que la eficacia biológica, la toxicidad hacia organismos no objetivos y el comportamiento en el medio ambiente de un gran número de plaguicidas quirales muestran una marcada enantioselectividad. En consecuencia, considerar a los enantiómeros de un plaguicida quiral como si se trataran de un único compuesto puede conducir a importantes errores en la predicción de la eficacia y del impacto ambiental del plaguicida. Por otra parte, cuando la eficacia biológica recae mayoritariamente sobre uno de los enantiómeros, a los habituales efectos adversos asociados al uso del plaguicida se añade el hecho de incorporar en el medio ambiente una fracción inactiva, sin utilidad real, que puede sobrecargar el suelo reduciendo su capacidad de auto-recuperación. Ante esto, las autoridades de distintos países han asumido la necesidad de regular el uso de los plaguicidas quirales, considerando el comportamiento de los enantiómeros por separado y, en ciertos casos, recomendando o imponiendo el uso del enantiómero activo puro en lugar de la mezcla racémica o mezcla de enantiómeros. Esta práctica supondría una reducción de las dosis de aplicación y, por tanto, una disminución de la contaminación del medio ambiente.

La hipótesis de partida para la presente Tesis Doctoral ha sido considerar que, dado que el comportamiento de los plaguicidas quirales en el suelo suele ser enantioselectivo, los posibles cambios en dicho comportamiento causados por prácticas agrícolas comunes también podrían afectar de forma diferente a cada uno de los enantiómeros. Por lo tanto, un conocimiento profundo de la actividad quiral de estos plaguicidas bajo diferentes condiciones de aplicación, facilitaría diseñar estrategias que permitan reducir el impacto contaminante de estos agroquímicos en el suelo y, en particular, establecer la idoneidad de aplicar exclusivamente el enantiómero activo para el tratamiento de la plaga a combatir.

2. OBJETIVOS

De este modo, el objetivo general de esta Tesis ha sido evaluar el comportamiento enantioselectivo de dos plaguicidas quirales, metalaxil e imazaquín, en dos suelos mediterráneos y estudiar el efecto sobre dicho comportamiento de prácticas agrícolas como la adición de residuos orgánicos, la enmienda con materiales arcillosos, la aplicación repetida del plaguicida y la variación de su dosis y forma de aplicación.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el carácter enantioselectivo de los procesos de adsorción, disipación y lixiviación de los plaguicidas seleccionados en dos suelos representativos de cultivos mediterráneos, de pH alcalino y bajo contenido en materia orgánica, pero con diferentes texturas y composición mineralógica.
2. Analizar comparativamente el efecto de la adición a los suelos de residuos de almazaras (alperujo, alperujo compostado y biochar) y de materiales arcillosos en la enantioselectividad de los procesos de adsorción, disipación y lixiviación de los plaguicidas seleccionados.
3. Estudiar el efecto de otras prácticas agrícolas como la aplicación sucesiva del plaguicida y la variación de su dosis o de su forma de aplicación (mezcla racémica frente a enantiómero purificado soportado o no en materiales arcillosos) en la persistencia y lixiviación de los plaguicidas en los suelos.

Además, sobre la base de los resultados anteriores, obtenidos en condiciones controladas de laboratorio, se diseñó un experimento de campo en parcelas experimentales para evaluar, bajo condiciones ambientales reales, el efecto de la adición de una arcilla modificada en la persistencia y movilidad de los enantiómeros del metalaxil. Asimismo, se realizaron bioensayos en macetas para comprobar la eficacia biológica de cada enantiómero del imazaquín e ilustrar los beneficios de la utilización de una formulación novedosa basada en el enantiómero activo soportado sobre partículas de arcilla.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. MATERIALES

3.1.1. Plaguicidas

3.1.1.1. Metalaxil

Metalaxil es el nombre comercial del metil-N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato. Es un fungicida polar perteneciente al grupo de las fenilacetamidas, con peso molecular de 279.3 g/mol, solubilidad en agua de 8.4 g/l (22 °C) y una presión de vapor de 0.75 mPa (25 °C) (Tomlin, 2006). Es un compuesto quiral que presenta un C asimétrico en su estructura, de modo que se identifican dos enantiómeros distintos: S-metalaxil y R-metalaxil (Figura 3.1). Se sabe que el enantiómero R es el principal responsable de la actividad fungicida (Buerge et al., 2003; Chen & Liu, 2009) y, de hecho, existen algunas formulaciones comerciales del producto enriquecidas (97%) con este enantiómero (metalaxil-M). Sin embargo, aún hoy, la venta del metalaxil como mezcla racémica sigue muy extendida.

Este fungicida sistémico es ampliamente utilizado en el control de las enfermedades causadas por patógenos de la división *Oomycota*, en particular contra *Phytophthora infestans* y *Pythium ultimum* en varios cultivos (Marucchini & Zadra, 2002). Su modo de acción consiste en la interacción con el complejo ARN-polimerasa I inhibiendo la incorporación de ribonucleótidos trifosfatos dentro de ARN ribosomal. El metalaxil se usa habitualmente a dosis de 0.5-1.5 kg/ha, aunque en España también se utiliza a elevadas dosis de hasta 20 kg/ha en algunos cultivos (MAPAMA, 2017). Una vez en el suelo, presenta una adsorción moderada ($K_{oc} = 70$ l/kg) y una persistencia también moderada (Tomlin, 2006). Su vida media, DT_{50} , es de unos 30 días, aunque puede variar según las condiciones y características del suelo considerado. El metalaxil es estable a la fotólisis tanto en medio acuoso como en suelos. Frente a la hidrólisis, este fungicida es estable a pH neutro y ácido (a temperatura ambiente). Sin embargo, a valores de pH alcalinos (> 10) es sensible a la hidrólisis, presentando una vida media de 12 días a pH= 10 (Tomlin, 2006).

El reactivo utilizado en los experimentos de laboratorio de este trabajo fue el metalaxil racémico de alta pureza (>99.6%) y grado analítico estándar proporcionado por Sigma-Aldrich. En el caso de los experimentos de campo, se utilizó un reactivo de metalaxil de grado técnico con una pureza del 97.7% proporcionado por Industrias Químicas de Navarra S.A. Para la asignación de los picos en el análisis quiral, se

empleó un reactivo de metalaxil-M de grado analítico estándar proporcionado por Sigma-Aldrich que contenía 96.8% de *R*-metalaxil y 3.2% de *S*-metalaxil (Celis et al., 2015a).

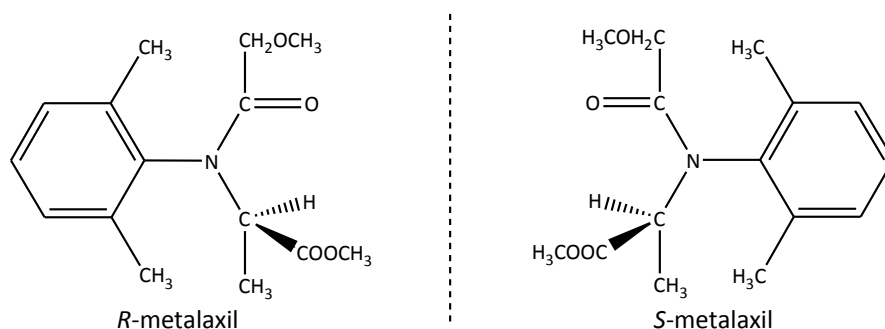


Figura 3.1. Estructura química de los enantiómeros del metalaxil.

3.1.1.2. Imazaquín

Imazaquín [ácido 2-(4-Isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1H-2-il)-quinolina-3-carboxílico]] es un herbicida sistémico perteneciente al grupo de las imidazolinonas, con peso molecular de 311.3 g/mol, solubilidad en agua de 60 mg/l (25 °C) y presión de vapor < 0.0013 mPa (60 °C). Este herbicida es un compuesto quiral que también presenta dos enantiómeros debido a la presencia de un C asimétrico en su estructura: *R*-imazaquín y *S*-imazaquín (Figura 3.2). Está documentado que el enantiómero *R* tiene una mayor actividad herbicida frente al *S* (Lao & Gan, 2005). Sin embargo, en la actualidad no se comercializan formulaciones de este herbicida enriquecidas con el enantiómero activo. Otra característica relevante de su estructura es que es un compuesto anfótero, es decir, que puede actuar como ácido o base en función del pH en el que se encuentre. Esto se debe a la presencia de varios grupos funcionales con carácter ácido-base en su molécula. La Figura 3.3 muestra los equilibrios ácido-base del imazaquín para los que se han determinado valores de constante de acidez de $\text{p}K_{\text{a}1} = 1.8$ (NH^+), $\text{p}K_{\text{a}2} = 3.8$ (COOH) y $\text{p}K_{\text{a}3} = 10.5$ (NH) (Weber et al., 2003).

El imazaquín se utiliza contra un amplio espectro de malas hierbas en arroz, soja y otros cultivos leguminosos. Este herbicida es absorbido fácilmente a través de

las raíces y las hojas de las plantas y actúa inhibiendo la enzima acetohidroxiácido sintasa, responsable de la biosíntesis de cadenas ramificadas de aminoácidos alifáticos en plantas. Esto causa la interrupción de la síntesis de proteínas, lo cual da lugar a interferencias en la síntesis de ADN y, por consiguiente, en el crecimiento celular. La dosis de aplicación de este herbicida en suelos es de 70-140 g/ha. En suelos agrícolas, a los valores comunes de pH (5-8), este herbicida se encuentra en forma aniónica y presenta una adsorción baja ($K_{oc} = 20$ l/kg) y una persistencia moderada-alta. Su vida media, DT_{50} , está en torno a 60 días, aunque también puede variar según las condiciones y tipo de suelo. El imazaquín es estable a la hidrólisis a temperatura ambiente cuando es almacenado en la oscuridad. Sin embargo, es sensible a la luz, degradándose rápidamente cuando es expuesto a radiación ultravioleta (Tomlin, 2006).

Para la realización de los experimentos de laboratorio, se utilizó imazaquín racémico de alta pureza (99.9%) y grado analítico estándar suministrado por Sigma-Aldrich.

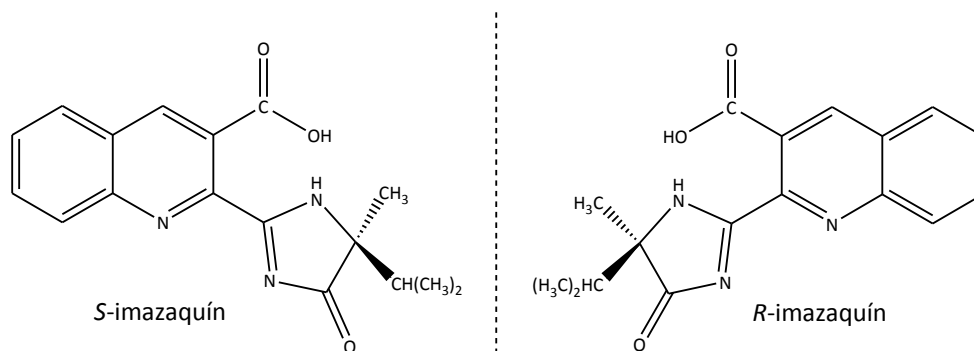


Figura 3.2. Estructura química de los enantiómeros del imazaquín.

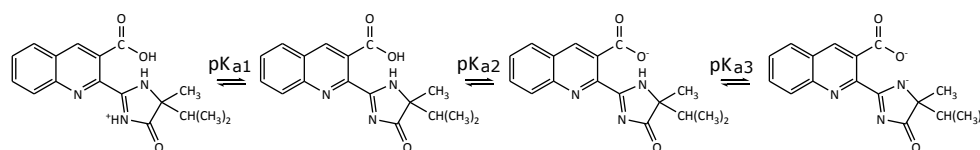


Figura 3.3. Equilibrios de ionización del imazaquín.

Purificación de los enantiómeros del imazaquín

Algunos experimentos de laboratorio se llevaron a cabo utilizando los enantiómeros puros del imazaquín. Para ello, los enantiómeros se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando el equipo y la columna que se especifican en el apartado 3.2.1.1. Las condiciones cromatográficas utilizadas en la separación fueron: fase móvil isocrática de HCl 0.001 M/acetonitrilo con un porcentaje 60:40 (v/v), flujo de 1 ml/min y detección a 250 nm. En cada inyección, se introdujo en el sistema un volumen de 50 µl de una disolución de 500 mg/l de imazaquín racémico preparado en fase móvil. La fracción del primer pico (*S*-imazaquín) fue recolectada a un tiempo de retención aproximado de 6.4-7.0 min y la fracción del pico 2 (*R*-imazaquín) a 7.4-8.1 min. Se recogieron alrededor de unos 100 ml de cada enantiómero, que se neutralizaron con 0.6 ml de NaOH (0.1 M) hasta alcanzar un valor de pH aproximado de 6. Finalmente, se evaporó el acetonitrilo de la disolución aplicando un flujo de N₂. La concentración de cada enantiómero en cada disolución (30 mg/l aprox.) se determinó por HPLC enantioselectiva (bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.1), obteniéndose una pureza > 99% para cada uno de ellos.

3.1.2. Suelos

En los experimentos de laboratorio descritos en esta memoria se utilizaron dos suelos agrícolas representativos de suelos mediterráneos con similares valores de pH y bajos contenidos de carbono orgánico, pero con diferentes texturas y composición mineralógica. Los suelos, procedentes de la provincia de Sevilla, fueron un suelo arcilloso originario de la localidad de las Cabezas de San Juan dedicado al cultivo de algodón (S1) y un suelo franco-arenoso procedente de la finca experimental “La Hampa” que el IRNAS (CSIC) posee en la localidad de Coria del Río dedicado al cultivo del olivar (S2). El experimento de campo se realizó en una de las parcelas de esta misma finca, presentando el suelo utilizado (S3) una textura también franco-arenosa.

Los suelos S1 y S2 fueron muestreados a una profundidad de 0-20 cm, secados al aire y, posteriormente, tamizados con una luz de malla de 2 mm. A continuación, se almacenaron en cámara fría a 4 °C hasta su caracterización y

posterior uso en los experimentos. Este mismo procedimiento se utilizó en el caso del suelo S3 para su caracterización. En la Tabla 3.1 se resumen la nomenclatura, procedencia, clasificación textural, uso y el tipo de experimento en el que se utilizó cada uno de los suelos.

Tabla 3.1. Procedencia, uso, textura y experimentos en los que fueron usados cada uno de los suelos.

Suelo	Procedencia	Textura	Uso	Experimento
S1	Las Cabezas de San Juan (Sevilla)	Arcillosa	Algodón	Laboratorio
S2	Coria del Río (Sevilla)	Franco-arenosa	Olivar	Laboratorio
S3	Coria del Río (Sevilla)	Franco-arenosa	Olivar	Campo

3.1.3. Adsorbentes

Los adsorbentes utilizados en este trabajo se resumen en la Tabla 3.2. En ella se detallan los diferentes plaguicidas y el tipo de experimento para los que se usó cada uno de ellos.

Tabla 3.2. Procedencia, plaguicidas y experimentos en los que se usó cada adsorbente.

Procedencia	Adsorbente	Plaguicida	Experimento
Residuos de almazara	ALP	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio
	ALPc	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio
	BC	Imazaquín	Laboratorio
Arcillas	HT-CO ₃	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio
	HT ₅₀₀	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio
	HT-ELA	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio
	HT-OLE	Metalaxil	Campo
	SA-HDTMA	Metalaxil/Imazaquín	Laboratorio

3.1.3.1. Residuos de almazara

Se utilizaron tres residuos orgánicos procedentes de dos almazaras distintas.

a) Alperujo fresco (ALP)

El alperujo fresco se obtuvo inmediatamente después de la etapa de centrifugación del proceso de extracción del aceite de oliva en dos fases en una almazara de Marchena (Sevilla). Para reducir el contenido de agua del residuo, se dejó secar al aire mediante volteo con máquinas de pala. Tras el secado, el ALP se trituró, tamizó a una luz de malla de 2 mm y almacenó a 4 °C hasta su posterior caracterización y uso en los experimentos.

b) Alperujo compostado (ALPc)

El alperujo compostado se obtuvo a partir de la descomposición aeróbica de un alperujo fresco procedente de una almazara de Jaén. Para ello, se dejó el alperujo fresco en un tanque para su secado al aire, favoreciendo el proceso de fermentación y consiguiendo disminuir el contenido de polifenoles, los cuales son fitotóxicos. Al alperujo fresco se le añadió restos de poda y hojas de olivo para favorecer la aireación. El proceso duró entre 4 y 6 meses. A continuación, el residuo fue molido y se hizo pasar por un tamiz de luz de malla de 2 mm. Finalmente, el ALPc se almacenó a 4 °C hasta su posterior caracterización y uso en los experimentos.

c) Biochar (BC)

El biochar se obtuvo sometiendo a un proceso de pirólisis una muestra del ALPc procedente de la almazara de Jaén. Para ello, una porción de 150 g de dicho residuo compostado se calentó a 400 °C durante 4 horas en un horno tubular bajo un flujo de N₂ a 1.5 l/min. El rendimiento de la preparación del BC fue de un 60% aproximadamente.

3.1.3.2. Arcillas

a) Síntesis de la hidrotalcita (HT-CO₃): Mg₃Al(OH)₈(CO₃)_{0.5}·mH₂O

La hidrotalcita utilizada en los experimentos de laboratorio fue sintetizada con una relación Mg:Al 3:1 y con carbonato como anión interlaminar por el método de coprecipitación (Reichle, 1986). Para ello, se añadió gota a gota 100 ml de una

disolución acuosa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.3 moles) y $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.1 moles) sobre 500 ml de una disolución acuosa alcalina de Na_2CO_3 (1.6 moles de NaOH y 0.37 moles de Na_2CO_3). Bajo estas condiciones, coprecipita el hidróxido doble laminar de $\text{Mg}:\text{Al}$ en una relación 3:1. A continuación, la suspensión resultante de la coprecipitación se sometió a un tratamiento hidrotermal en un reactor de teflón a una temperatura comprendida entre 80-90 °C durante 24 horas. Tras centrifugar la suspensión y lavar el sólido cinco veces con agua destilada, el precipitado obtenido se liofilizó y guardó en un medio anhidro.

b) Obtención de la hidrotalcita calcinada (HT_{500}): $\text{Mg}_6\text{Al}_2\text{O}_9$

Para la obtención de la hidrotalcita calcinada, HT_{500} , se tomó una porción de la HT-CO_3 sintetizada y se calentó a 500 °C en una mufla durante 3 horas, obteniéndose el óxido mixto metálico amorfo correspondiente (Miyata, 1980).

c) Síntesis de hidrotalcita modificada con anión elaidato (HT-ELA)

La organo-hidrotalcita HT-ELA se sintetizó siguiendo el procedimiento de reconstrucción basado en la reversibilidad del proceso de calcinación (Chibwe & Jones, 1989; Cavani et al., 1991; Pavlovic et al., 1997). Para ello, se realizó la hidratación de una porción de HT_{500} (0.5 g) con una disolución alcalina de ácido eláidico (3 mmoles de ácido eláidico disuelto en 110 ml de una disolución de NaOH 30 mM) en una estufa a 60 °C con agitación constante, tal y como describen Celis et al. (2014). Pasadas 24 horas, la suspensión se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El sólido se lavó dos veces con agua Milli-Q (100 ml) y se secó en estufa a 60 °C. Finalmente, la organo-hidrotalcita se homogeneizó en un mortero de ágata y guardó en botes opacos cerrados herméticamente.

d) Síntesis de hidrotalcita modificada con anión oleato (HT-OLE)

La hidrotalcita con oleato intercalado utilizada en los experimentos de campo se sintetizó mediante un proceso similar al método de reconstrucción descrito en el apartado anterior. Se tomó 50 g de una hidrotalcita comercial con una pureza del 99% suministrada por Sigma-Aldrich y se calcinó a 500 °C durante 2 h. A continuación, se adicionó la hidrotalcita calcinada a una disolución de oleato sódico (80%, Sigma-Aldrich) de una concentración de 50 g/l (75 g de oleato sódico disuelto en 1.5 l de agua destilada a 60 °C). La suspensión se agitó durante 24 horas a una temperatura de

60 °C en estufa. Transcurrido este tiempo, la suspensión se filtró (tamaño de poro= 0.45 µm) y el sólido resultante se secó a 60 °C, obteniéndose, finalmente, la hidrotalcita modificada con oleato (HT-OLE).

e) Síntesis de montmorillonita modificada con hexadeciltrimetilamonio (SA-HDTMA)

La síntesis de la muestra SA-HDTMA se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Celis et al. (2007). Se tomó una porción de montmorillonita SAz-1, rica en Ca^{2+} , suministrada por “The Clay Minerals Society” (100 g) y se trató con una disolución de etanol:agua (50:50) con un contenido del cloruro de alquilamonio equivalente al 100% de la capacidad de intercambio catiónico de la arcilla (1200 mmol/kg). La suspensión se agitó durante 24 horas, se centrifugó y el sólido resultante se lavó tres veces con una mezcla al 50% de etanol:agua. Posteriormente, se lavó con agua destilada, se liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

3.1.3.3. Complejos arcilla-imazaquín

a) Síntesis del complejo de HT con *R*-imazaquín

Para la síntesis de este complejo, se pesó 15 mg de HT₅₀₀ obtenida del modo descrito en el apartado 3.1.3.2 y se añadió 10 ml de una disolución acuosa de 30 mg/l de enantiómero *R*-imazaquín. Se agitó la suspensión 24 horas y, transcurrido este tiempo, se filtró a vacío y el papel de filtro que contenía el complejo se secó en estufa a 60 °C. El líquido obtenido tras el filtrado se analizó por HPLC para determinar la concentración de herbicida no adsorbido y, a partir de ella, el porcentaje de imazaquín en el complejo. Con fines comparativos y en algunos experimentos de caracterización se preparó un complejo similar con imazaquín racémico.

b) Síntesis del complejo de SA-HDTMA con *R*-imazaquín

Para la síntesis de este complejo, se puso en contacto 25 mg de la arcilla SA-HDTMA con 10 ml de una disolución acuosa de *R*-imazaquín de 30 mg/l y se agitó durante 24 horas. Pasado este tiempo, la suspensión se filtró a vacío y el sólido obtenido se secó en estufa a 60 °C. El sobrenadante se midió por HPLC para determinar, de forma indirecta, el porcentaje de herbicida en el complejo formado.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Método analítico para la determinación de los plaguicidas

3.2.1.1. Análisis quiral

El método analítico para obtener las concentraciones de los enantiómeros individuales de los plaguicidas fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en su modalidad quiral. Esta técnica se basa en el uso de una fase estacionaria quiral cuya diferente afinidad por los enantiómeros del plaguicida lleva a la separación de los mismos en el análisis cromatográfico. Se utilizó un cromatógrafo de la casa comercial Waters Millipore, formado por un controlador de sistema *Waters 600E System Controller*, un detector de radiación ultravioleta emitida por lámpara de deuterio *Waters 998 Photodiode Array Detector* y un inyector automático de muestras *Waters 717 Autosampler*. Para ambos plaguicidas, el flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y se utilizaron patrones externos para su calibración. La columna utilizada para el análisis de metalaxil fue una columna *Chiralpak IB* (150 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula). En el caso del herbicida imazaquín se empleó una columna *Chiralcel OD-3R* (150 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, 3 μm de tamaño de partícula). Ambas columnas presentan una fase estacionaria compuesta por un selector quiral de celulosa derivatizada con tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) soportado sobre partículas de sílice macroporosa (Figura 3.4). En el caso de la columna *Chiralcel OD-3R*, la fase estacionaria se fabrica por recubrimiento físico del polímero sobre la sílica gel (coated chiral stationary phase), mientras que en la columna *Chiralpak IB* el selector quiral está inmovilizado en el soporte mediante una técnica novedosa (immobilized chiral stationary phase) que proporciona mejoras en las características de las columnas, como una mayor robustez y mejor reproducibilidad.

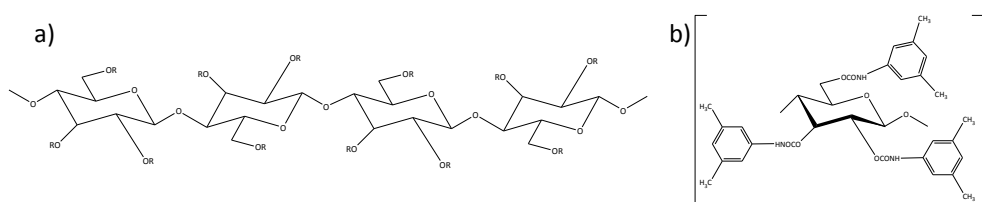


Figura 3.4. Estructura del polímero (a) y del monómero (b) del selector quiral.

En la Tabla 3.3 se describen el resto de las condiciones utilizadas para el análisis de cada plaguicida. Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se calcularon como la concentración correspondiente a una relación señal:ruido 3:1 y 10:1, respectivamente (Camacho-Muñoz et al., 2009). La Figura 3.5 muestra ejemplos de cromatogramas representativos de disoluciones acuosas racémicas de metalaxil e imazaquín de 6 mg/l junto con los respectivos espectros de absorción de cada enantiómero. La asignación de los picos del metalaxil se llevó a cabo por comparación del tiempo de retención de un patrón de metalaxil-M (*R*-metalaxil) con un cromatograma de un patrón de *rac*-metalaxil, obteniéndose que el segundo pico eluido correspondía al enantiómero *R*. En el caso de los picos de imazaquín, éstos fueron nombrados de acuerdo con los resultados de un bioensayo con *Brassica oleracea botrytis* en el que el enantiómero con mayor actividad herbicida, que se asignó como enantiómero *R* (Lao & Gan, 2005; Ramezani et al., 2010), fue el obtenido a un mayor tiempo de retención (ver apartado 4.3.4.1).

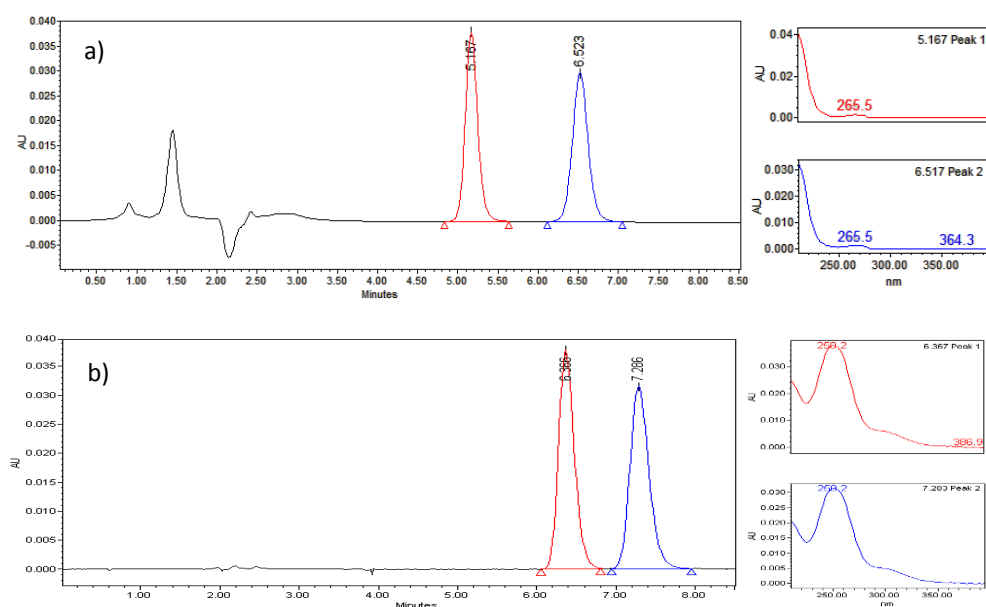


Figura 3.5. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC quiral para los plaguicidas metalaxil (a) e imazaquín (b) con una disolución racémica patrón de 6 mg/l.

3.2.1.2. Análisis aquiral

Para ciertos experimentos preliminares y complementarios, se utilizó HPLC con columnas aquirales. Asimismo, se realizaron análisis aquirales para comprobar su correspondencia con el análisis quiral de los enantiómeros individuales. Los análisis se realizaron en el mismo cromatógrafo de la casa comercial Waters Millipore descrito en el apartado 3.2.1.1. La columna empleada fue una columna *Kinetex C18*, 5 μm 100 Å (150 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas descritas para el análisis quiral de cada plaguicida (apartado 3.2.1.1). El tiempo de retención del pico del metalaxil fue de 4.9 min, mientras que para el pico de imazaquín fue de 3.3 min.

En la Figura 3.6 están representados ejemplos de cromatogramas de disoluciones acuosas racémicas de ambos plaguicidas de concentración de 6 mg/l y sus respectivos espectros de absorción. En ellos, los dos enantiómeros aparecen como un único pico cromatográfico.

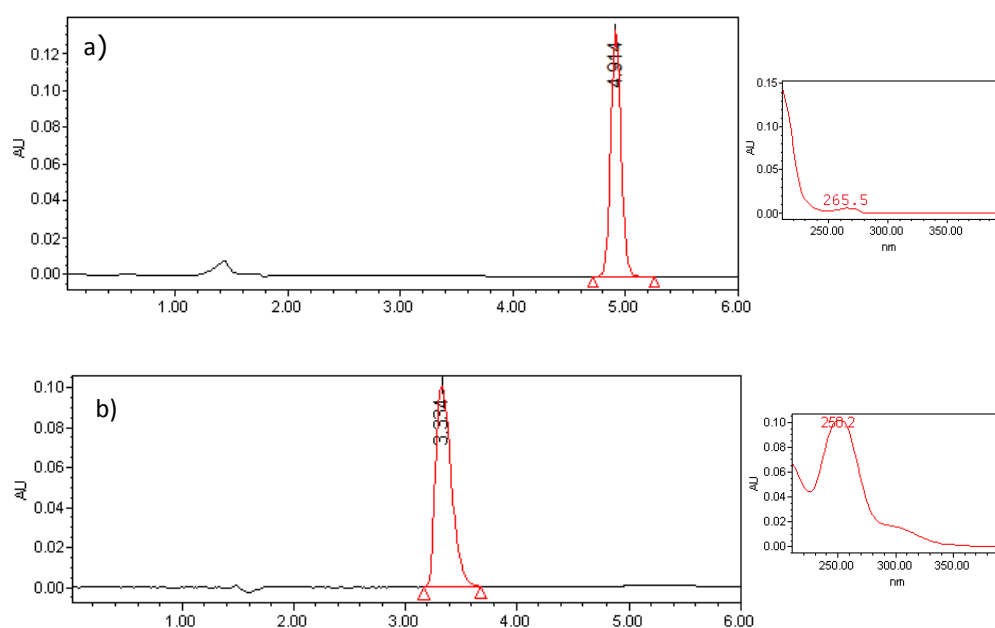


Figura 3.6. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC aquiral para los plaguicidas metalaxil (a) e imazaquín (b) con una disolución racémica patrón de 6 mg/l.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.3. Condiciones de análisis de los plaguicidas por HPLC enantioselectiva.

Plaguicida	Fase móvil ^a	V _{inyección} (μl)	λ _{detección} (nm)	Tiempo de retención (min)	LD (mg/l)	LC (mg/l)
Metalaxil	H ₂ O:AcN (60:40)	50	213	t _{S-metalaxil} = 5.2 t _{R-metalaxil} = 6.5	0.006	0.02
Imazaquín	H ₃ PO ₄ /AcN (60:40) pH=2	25	250	t _{S-imazaquín} = 6.4 t _{R-imazaquín} = 7.3	0.006	0.02

^a AcN: acetonitrilo

3.2.2. Caracterización de los suelos

La caracterización de los suelos se realizó en los laboratorios del servicio de análisis del IRNAS siguiendo los procedimientos convencionales descritos en la bibliografía (Tabla 3.4). La clase textural de los suelos se determinó por sedimentación siguiendo el método descrito por Gee & Bauder (1986). El contenido de carbono orgánico se obtuvo por oxidación con dicromato (Nelson & Sommer, 1982) y el contenido en carbonatos a través de la descomposición por la acción de HCl (Nelson, 1982). El pH y la conductividad fueron analizados en suspensiones suelo:agua mediante potenciometría y conductimetría respectivamente.

Adicionalmente a los experimentos de caracterización convencionales, se realizaron análisis de las distribuciones de tamaño de poro y de la mineralogía de las fracciones arcilla de los suelos. Las distribuciones de tamaño de poro se obtuvieron por porosimetría de intrusión de mercurio a agregados de suelo usando un porosímetro modelo *AuroPore IV 9500* de Micromeritics. La fracción arcilla de los suelos (fracción de tamaño de partícula < 2 μm) se obtuvo por sedimentación tras eliminar los carbonatos con acetato/acético (pH=5) (Jackson, 1975). La mineralogía de las fracciones arcilla se determinó por difracción de rayos X sobre agregados orientados saturados en Mg²⁺ y K⁺, tratados con etilenglicol y calcinados a 500 °C, respectivamente (Brown, 1961).

Tabla 3.4. Parámetros determinados para los suelos y técnica utilizada.

Parámetro	Técnica analítica
Textura	Sedimentación (Gee & Bauder, 1986)
Contenido de C orgánico	Oxidación por dicromato (Nelson & Sommer, 1982)
Contenido en carbonatos	Descomposición con HCl (Nelson, 1982)
pH	Potenciometría sobre una suspensión 1:2.5 de suelo:H ₂ O
Conductividad	Conductimetría sobre una suspensión 1:5 de suelo:H ₂ O
Distribución de tamaños de poro (40-0.004 µm)	Porosimetría de intrusión de mercurio a agregados de suelo (porosímetro modelo <i>AutoPore IV 9500</i> de Micromeritics).
Mineralogía de la fracción arcilla	Difracción de rayos X (Brown, 1961)

3.2.3. Caracterización de los adsorbentes

3.2.3.1. Caracterización de las enmiendas orgánicas

La caracterización de las enmiendas orgánicas, ALP, ALPc y BC, fue realizada por el servicio de análisis del IRNAS. Los parámetros analizados se resumen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros determinados para los alperujos y técnica empleada.

Parámetro	Técnica analítica
Humedad	Gravimetría (secado a 105 °C)
pH	Potenciometría sobre una suspensión 1:5 enmienda:H ₂ O
Conductividad	Conductimetría sobre una suspensión 1:5 enmienda:H ₂ O
Carbono total	Analizador de carbono con módulo de nitrógeno
Materia Orgánica	Calcinación (a 550 °C)
Cenizas	Calcinación (a 550 °C)
N total (Kjedahl)	Destilación-valoración automática

Se realizó un análisis adicional de la materia orgánica soluble (MOS) de las enmiendas orgánicas por espectroscopía de fluorescencia. Para ello, se puso en

agitación 1 g de cada una de las enmiendas (ALP, ALPc y BC) con 20 ml de una disolución de CaCl_2 (0.01 M). Tras 15 minutos, las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes se retiraron y filtraron con filtros de 0.45 μm . Previamente a la medida de fluorescencia, las muestras se diluyeron hasta obtener por espectrofotometría UV-VIS un valor de absorbancia a 254 nm menor a 1 (Cox et al., 2000b). Una vez conseguida la dilución adecuada (1:1250), las muestras se midieron en un espectrofotómetro (*F-2500 FL-Spectrophotometer HITACHI*) con una longitud de onda de excitación de 254 nm. El espectro de emisión de fluorescencia se registró en un rango de 300 a 480 nm, a una velocidad de barrido de 60 nm/min. Tras obtener los espectros de fluorescencia, se calculó el índice de humificación (IH) empleando la ecuación (Cox et al., 2000b).

$$IH = \frac{\sum_{\lambda=435}^{480} I_{\lambda}}{\sum_{\lambda=300}^{345} I_{\lambda}} \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde λ corresponde a la longitud de onda de la radiación emitida en nanómetros y I_{λ} es la intensidad de emisión a una longitud de onda determinada. Asimismo, se determinó la concentración de carbono orgánico en los extractos de MOS usando un analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu TOC-V sch.

3.2.3.2. Caracterización de las arcillas

La caracterización de las arcillas preparadas se llevó a cabo mediante técnicas de análisis elemental, difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier y, en el caso de la muestra HT-ELA, de resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^1H (Figura 3.7). A continuación, se describen brevemente los procedimientos:

a) Análisis elemental: El contenido de Al y Mg de las muestras HT- CO_3 , HT₅₀₀, HT-ELA y HT-OLE se determinó mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (IPC-OES) utilizando un espectrofotómetro *ICP-OES Varian ICP 720-ES*, previa digestión de las muestras con HCl (37%). Por otro lado, la cantidad de C y N de todas las arcillas se midió en un analizador *Perkin-Elmer modelo 1106* directamente sobre las muestras sólidas.

b) Difracción de rayos X: Los difractogramas de las hidrotalcitas (HT-CO₃ y HT₅₀₀) y organo-hidrotalcitas (HT-ELA y HT-OLE) se obtuvieron directamente sobre las muestras sólidas en forma de polvo. En el caso de la muestra SA-HDTMA, el análisis se realizó sobre agregados orientados de la organo-arcilla. Para ambos análisis se utilizó un difractómetro *Siemens D-5000* con radiación CuK_α bajo las condiciones de 40 kV de voltaje, una intensidad de 30 mA, velocidad de barrido de 2°/min y paso de 0.02° en unidades 2θ. Además, en el caso de la muestra HT-ELA, para poder obtener una mayor resolución a ángulos bajos, se usó un segundo difractómetro modelo *D8 Discover* de la marca BRUCKER con las mismas condiciones de operación.

c) Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier: Se empleó un espectrómetro *Jasco FT / IR 6300* (JASCO EUROPA SRL) colocando directamente las muestras sólidas en un portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR). El barrido se realizó en el intervalo entre 400 y 4000 cm⁻¹, utilizando un promedio de 32 registros para mejorar la relación señal:ruido. A los espectros obtenidos se les restó el de un blanco sobre la celda vacía para salvar las interferencias producidas por el CO₂ y vapor de agua atmosférico.

d) Resonancia magnética nuclear: Los espectros de ¹³C-NMR y ¹H-NMR de la organo-hidrotalcita HT-ELA se registraron en un espectrómetro *Bruker Avance DRX-400* con una sonda multinuclear, utilizando un rotor de óxido de zirconio girando a 10 KHZ. Los desplazamientos químicos se referenciaron al tetrametilsilano (TMS).

3.2.3.3. Caracterización de los complejos arcilla-imazaquín

a) Extracción de imazaquín de los complejos

Para determinar de forma directa la cantidad de herbicida presente en los complejos arcilla-imazaquín preparados se llevó a cabo la extracción de los mismos, seguido de la medida de los extractos por HPLC. En el caso del complejo de SA-HDTMA con *R*-imazaquín, se pesó 0.5 mg del complejo y se le adicionó 10 ml de una mezcla H₃PO₄ diluido (pH=2)/acetonitrilo 60:40 (v/v). Tras 24 horas de agitación, las suspensiones se centrifugaron y el sobrenadante se filtró y midió por HPLC para determinar la cantidad de *R*-imazaquín extraída. En el caso del complejo de HT con *R*-imazaquín, se pesó 1 mg de complejo, se le agregó 1 ml de HCl al 37% y se agitó en un agitador vórtex con el fin de conseguir la disolución de las láminas de hidrotalcita. Una

vez que el complejo estuvo completamente disuelto, se diluyó con 9 ml de una mezcla H_3PO_4 diluido (pH=2)/acetonitrilo (60:40) y la disolución se filtró y analizó por HPLC para determinar la cantidad de *R*-imazaquín en el complejo.

b) Cinética del complejo de HT-Imazaquín

Al medir la cantidad de imazaquín adsorbido en la arcilla HT de forma directa, se observó cierta degradación del herbicida en el complejo con el paso del tiempo. Por ello, se siguió la cinética de degradación del imazaquín en un complejo de HT análogo preparado con *rac*-imazaquín, analizando periódicamente la cantidad de herbicida extraíble tal y como se describe en el apartado anterior. Con fines comparativos, también se preparó una disolución de *rac*-imazaquín de 30 ppm ajustando su pH a un valor similar al pH del sobrenadante del complejo durante su síntesis, que sirvió como control. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis del imazaquín extraído durante la cinética fueron las mismas descritas para el análisis aquiral del herbicida (apartado 3.2.1.2).

c) Identificación del producto de degradación del imazaquín en el complejo

Con el fin de verificar una posible degradación del herbicida en el complejo HT-Imazaquín, se preparó una muestra de complejo de HT con *rac*-imazaquín y se dejó en reposo, preservado de la luz, durante 54 días. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 mg del complejo, se disolvió en 1 ml de HCl concentrado (37%) y se diluyó en ácido fórmico al 0.1% en agua Milli-Q hasta un volumen de 10 ml. Esta disolución se volvió a diluir con la disolución de ácido fórmico (1:100). Tras la preparación de la muestra, los compuestos presentes se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa en tándem (LC-MS/MS). El sistema cromatográfico estaba constituido por un inyector automático de muestras *HTS PAL Analytic*, un módulo de control *Agilent serie 1100* con una bomba binaria de HPLC con desgasificador de vacío, una bomba auxiliar *Jasco PU 980* y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo *API 4000* con fuente de ionización *turbo ion spray*. La columna utilizada fue una columna C 18 *Phenomenex Aqua 125 A* (50 mm de longitud x 2 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula). Las condiciones cromatográficas fueron fase móvil en gradiente con ácido fórmico al 0.1% en agua y acetonitrilo como eluyentes. El gradiente utilizado partía de una composición inicial de 100% de ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta alcanzar un porcentaje de 0% a los

10 min (flujo de 0.2 ml/min). Este estudio se llevó a cabo durante una estancia breve realizada en el Institute for Plant Production Sciences de Agroscope (Suiza), por su gran experiencia en la caracterización de productos de degradación de plaguicidas quirales en muestras ambientales.



Figura 3.7. Instrumentación utilizada para la caracterización de las arcillas y complejos arcillas-imazaquín: espectrómetro de RMN *Bruker Avance DRX-40* (a), difractómetro de rayos X *Siemens D-5000* (b), espectrómetro IRTF *Jasco FT / IR 6300* (c), espectrofotómetro *ICP-OES Varian ICP 720-ES* (d) y un sistema cromatográfico constituido por un inyector *HTS PAL Analytic*, un módulo de control *Agilent serie 1100*, una bomba auxiliar *Jasco PU 980* y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo *API 4000* (e).

3.2.4. Estudio del comportamiento enantioselectivo de los plaguicidas quirales en los suelos: Experimentos de laboratorio

3.2.4.1. Estudios de adsorción y desorción

3.2.4.1.1. Adsorción de los plaguicidas a los adsorbentes

a) Estudio preliminar a concentración única

Para llevar a cabo una estimación inicial de la capacidad adsorbente de los residuos y arcillas para los plaguicidas estudiados, se realizó un estudio de adsorción preliminar a una única concentración de los plaguicidas. Para ello, se puso en contacto, por triplicado, 100 mg de los residuos orgánicos (ALP, ALPc o BC) o 10-20 mg de las arcillas con 8 ml de una disolución acuosa de *rac*-metalaxil a una concentración inicial (C_{ini}) de 2 mg/l (1 mg/l de cada enantiómero) o bien de $C_{ini} = 1$ mg/l para el caso del *rac*-imazaquín (0.5 mg/l de cada enantiómero). Tras 24 horas de agitación a 20 ± 2 °C, las muestras se centrifugaron, se filtraron con filtros GHP (diámetro de poro 0.45 μ m) y se midió la concentración de cada uno de los enantiómeros del plaguicida en la disolución de equilibrio, C_e (mg/l), por HPLC enantioselectiva, según se describe en el apartado 3.2.1.1. Durante todo el experimento de adsorción, se llevó un control consistente en triplicados de la disolución inicial del plaguicida sin adsorbente.

A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de plaguicida total y de cada enantiómero adsorbido (%), mediante la ecuación:

$$\% Ads = \frac{(C_{ini} - C_e)}{C_{ini}} \times 100 \quad \text{Ec. 3.2}$$

La cantidad de plaguicida total o enantiómero adsorbido, C_s (mg/kg), se determinó mediante la expresión:

$$C_s = \frac{(C_{ini} - C_e)}{M} \times V \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde:

C_s : cantidad adsorbida (mg/kg)

C_{ini} : concentración inicial (mg/l)

C_e : concentración en la disolución de equilibrio (mg/l)

V : volumen de la disolución (l)

M: masa de adsorbente (kg)

A partir de los datos de C_s y C_e obtenidos, se calculó el coeficiente de distribución K_d (l/kg) utilizando la ecuación 1.1 (apartado 1.2.1.1)

b) Isotermas de adsorción-desorción

Para las enmiendas orgánicas y arcillas que en el estudio preliminar a concentración única presentaron buenas propiedades adsorbentes, se obtuvieron sus isotermas de adsorción-desorción. Para ello, se pesaron, por triplicado, 100 mg de los residuos orgánicos (ALP, ALPc y BC), 10 mg de la muestra HT-ELA o 20 mg de muestra de SA-HDTMA a los que se adicionó 8 ml de disoluciones acuosas de metalaxil racémico o imazaquín racémico a diferentes concentraciones iniciales (2, 5, 10, 20, y 30 mg/l en el caso de *rac*-metalaxil y 0.5, 1, 2 y 5 mg/l en el caso del *rac*-imazaquín) y se equilibró durante 24 horas a 20 ± 2 °C. Transcurrido ese tiempo, las suspensiones se centrifugaron y se retiraron 4 ml del sobrenadante, que se filtró y midió por HPLC enantioselectiva para determinar la concentración de cada uno de los enantiómeros del plaguicida en disolución. Igualmente, se agitaron por triplicado muestras control o blancos consistentes en 8 ml de cada disolución inicial del plaguicida sin adsorbente.

La desorción se realizó inmediatamente después del experimento de adsorción mediante el método de las diluciones sucesivas. Se tomó la disolución de mayor concentración inicial (30 mg/l en el caso de las isotermas de metalaxil y 5 mg/l en el caso de imazaquín) y los 4 ml de sobrenadante retirados para la medida de la adsorción se reemplazaron por 4 ml de agua destilada. Se resuspendió el sólido y se volvió a equilibrar la suspensión durante 24 horas a 20 ± 2 °C, tras lo cual se volvió a determinar la concentración de los enantiómeros del plaguicida en disolución. Este procedimiento se repitió 3 veces en tres días sucesivos. En la Figura 3.8 se representa un esquema del procedimiento de adsorción-desorción realizado.

Las isotermas de adsorción-desorción se obtuvieron representando la concentración de plaguicida total o de cada enantiómero adsorbido (C_s) frente a su concentración de equilibrio (C_e) y se ajustaron a la ecuación de Freundlich en su forma logarítmica (Ec. 1.3) para obtener las constantes empíricas de la ecuación K_f y N_f .

3.2.4.1.2. Adsorción de los plaguicidas a los suelos sin enmendar y enmendados

Para cada plaguicida, se obtuvieron las isotermas de adsorción a los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con aquellos residuos orgánicos y arcillas que presentaron mejores propiedades adsorbentes. Por triplicado, 1 g de suelo sin enmendar o enmendado con ALP (2%), ALPc (2%) y HT-ELA (0.5 y 1%) para el caso del metalaxil y de suelo enmendado con SA-HDTMA (5%) para el caso del imazaquín, se agitaron 24 horas a 20 ± 2 °C con 8 ml de disoluciones del plaguicida a diferentes concentraciones iniciales, C_{ini} (2, 5, 10, 20, y 30 mg/l de *rac*-metalaxil y 0.5, 1, 2 y 5 mg/l de *rac*-imazaquín). Al igual que se describe en el apartado 3.2.4.1.1, tras centrifugar las suspensiones, se retiraron 4 ml del sobrenadante que fueron filtrados y medidos por HPLC enantioselectiva para determinar la concentración de cada enantiómero en disolución. Tras el experimento de adsorción, se realizó la desorción para las muestras equilibradas con las disoluciones de concentraciones iniciales de plaguicidas más altas. La desorción se realizó del mismo modo descrito en el apartado 3.2.4.1.1.

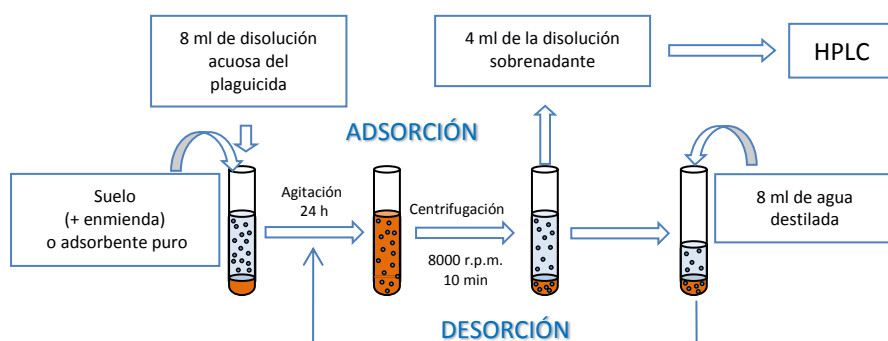


Figura 3.8. Esquema del experimento de adsorción-desorción.

3.2.4.2. Estudios de persistencia

3.2.4.2.1. Estudios de persistencia en suelos sin enmendar y enmendados con los adsorbentes

Los estudios de persistencia o disipación se llevaron a cabo mediante incubaciones de suelo sin enmendar y enmendado con los adsorbentes en condiciones aeróbicas y de oscuridad a 20 ± 2 °C. Se pesaron 100 g de suelo en un recipiente de vidrio con cierre hermético (Figura 3.9a) y se adicionó agua destilada para conseguir un porcentaje de humedad próximo a la capacidad de campo de los suelos (40% para el suelo 1 y 30% para el suelo 2). Se prepararon incubaciones de ambos suelos sin enmendar, enmendados con ALP y ALPc (2%) para los dos plaguicidas, HT-ELA (0.5 y 1%) exclusivamente para el metalaxil y BC (2%) y SA-HDTMA (1 y 5%) para el imazaquín. Se añadió el plaguicida en su forma racémica a una dosis de 2 mg/kg (1 mg/kg de cada enantiómero) y se homogeneizó la mezcla con espátula esterilizada. En el caso del herbicida imazaquín, para ambos suelos no enmendados, también se realizaron incubaciones de los enantiómeros puros, *S*- y *R*-imazaquín por separado, añadiendo una dosis de 1 mg/kg de cada uno de ellos. Periódicamente, se tomaron muestras de los suelos (3 g) por triplicado y se congelaron inmediatamente a -20 °C hasta su análisis. Durante todo el periodo de incubación (50 y 75 días para las incubaciones de metalaxil y de imazaquín respectivamente) se mantuvo el contenido de humedad constante adicionando agua destilada cuando fue necesario. Posteriormente, para su análisis, se extrajeron las muestras congeladas con 8 ml de metanol en el caso del metalaxil, y con 8 ml de una mezcla H_3PO_4 diluido (pH=2):acetonitrilo (60:40) en el caso del imazaquín. Tras 24 horas de agitación, las suspensiones de suelo se centrifugaron y el sobrenadante se filtró y se midió por HPLC enantioselectiva para determinar la concentración de cada enantiómero presente en las muestras.

A determinados tiempos de incubación, también se tomaron, por duplicado, muestras de 5 g de suelo que se colocaron en tubos de centrifuga tipo PALL, los cuales contienen una membrana de 0.45 μm con la finalidad de proporcionar una alícuota de la disolución del suelo tras su centrifugación (Figura 3.9b). De esta forma, se centrifugó a 8000 rpm, obteniéndose la alícuota de disolución del suelo que se analizó por HPLC enantioselectiva. A partir de los datos obtenidos del análisis de la disolución del suelo y de la cantidad total de plaguicida obtenida a partir de las extracciones de

las muestras de incubación a esos días, se calculó el valor de la K_d para cada enantiómero según la Ec 1.1, donde C_s es la cantidad adsorbida y se calculó por diferencia entre la concentración de plaguicida obtenida de la extracción del suelo y la concentración de equilibrio obtenida de los tubos PALL (C_e).

Las curvas de disipación se ajustaron a cinéticas de primer orden en las que la velocidad de degradación es proporcional a la concentración de compuesto existente en el suelo. Para las cinéticas de primer orden, el descenso de la concentración del plaguicida con el tiempo puede describirse como:

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Ec. 3.4}$$

donde C es la concentración (mg/kg), t es el tiempo (días) y k es la constante de velocidad de degradación (días^{-1}). La forma integrada de la ecuación es:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde C es la concentración del plaguicida en el tiempo t (mg/kg) y C_0 es la concentración en el tiempo 0 (mg/kg). La forma logarítmica de la Ec. 3.5 da lugar a una relación lineal entre el $\ln C$ y el tiempo t .

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Ec. 3.6}$$

A partir del valor de k puede calcularse el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que se define como el tiempo necesario para que se degrade el 50% de la cantidad de plaguicida inicialmente presente:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Ec. 3.7}$$

Los valores C_0 y k se estimaron ajustando los valores experimentales de C y t a la ecuación exponencial (Ec. 3.5). También es posible ajustar dichos valores a la ecuación logarítmica (Ec. 3.6); sin embargo, es recomendable el uso de la ecuación exponencial, a menos que existan evidencias experimentales que sugieran lo contrario (Beulke et al., 2001).



Figura 3.9. Fotografía de los botes utilizados en los experimentos de incubación (a) y tubos Pall (b).

3.2.4.2.2. Estudios de persistencia con aplicaciones sucesivas

Se estudió el efecto en la disipación de una segunda aplicación del plaguicida tanto para el metalaxil como para el imazaquín. Para ello, se tomaron 200 g de suelo S2 y se procedió del mismo modo que se describió anteriormente en el apartado 3.2.4.2.1. Tras finalizar el periodo de incubación (50 días para las incubaciones de metalaxil y 75 días para el imazaquín), se volvió a aplicar una dosis del plaguicida en su forma racémica de 2 mg/kg. Al igual que en la primera incubación, se tomaron muestras periódicamente y se congelaron. El periodo de incubación, tras la segunda aplicación, fue de 41 días para el experimento de persistencia con metalaxil y de 75 días para el caso del imazaquín. El día del análisis, se extrajeron las muestras con el extractante adecuado y se analizó por HPLC enantioselectiva.

3.2.4.2.3. Estudio de persistencia a elevada dosis de metalaxil

Puesto que en algunos cultivos está autorizado el uso del metalaxil a dosis elevadas cercanas a 10-20 kg/ha, se realizó un experimento de persistencia incrementando la dosis de fungicida a 20 mg/kg. Se pretendió así comprobar el posible efecto tóxico de una mayor cantidad de fungicida en el suelo en la flora microbiana autóctona y su repercusión en la persistencia del fungicida en el suelo. Para ello, se pesó 100 g de suelo S2 y se procedió de idéntica forma a la descrita en el apartado 3.2.4.2.1 con la salvedad de que la dosis de metalaxil racémico añadida fue de 20 mg/kg.

3.2.4.3. Estudios de lixiviación

3.2.4.3.1. Estudios de lixiviación en los suelos sin enmendar y enmendados con los adsorbentes

Los estudios de lixiviación se llevaron cabo en columnas de vidrio de 30 cm de longitud y 3.1 cm de diámetro interno. En la parte inferior de la columna se colocó lana de vidrio y 10 g de arena de mar de grano grueso. A continuación, las columnas se rellenaron en cuatro tramos de 5 cm con aproximadamente 40 g de suelo en cada uno de ellos (160 g en total). Se prepararon, por triplicado, columnas con ambos suelos sin enmendar, enmendados con residuos orgánicos en toda la columna (2% ALP, 2% ALPc para ambos plaguicidas y 2% BC para el imazaquín exclusivamente) y con arcilla en los 2.5 primeros centímetros del suelo (0.5 y 1% de HT-ELA para metalaxil y 1% y 5% SA-HDTMA para imazaquín). En la parte superior de la columna, se adicionaron 10 g de arena de mar para evitar la formación de canales de flujo preferencial y mejorar la distribución del plaguicida y del agua durante su aplicación (Figura 3.10). Las columnas se saturaron con 100 ml de agua destilada y se dejó lixiviar durante 24 horas. Se midió el volumen del agua recogida para determinar el volumen de poro de la columna, siendo éste la diferencia entre el volumen de agua adicionado y el recogido por percolación: 65 ± 1 ml para las columnas con suelo S1 y 61 ± 1 ml para las columnas con suelo S2. Tras la saturación, se añadió el plaguicida en su forma racémica en cantidad representativa de dosis de campo: 2 kg/ha de *rac*-metalaxil y 0.2 kg/ha de *rac*-imazaquín. Asimismo, para el caso del imazaquín, se prepararon columnas de ambos suelos sin enmendar, a las que se les aplicó una dosis de 0.1 kg/ha de cada enantiómero puro por separado.

Las columnas se regaron diariamente con 15 ml de agua destilada, se dejaron drenar 24 horas y se recogieron los lixiviados que, posteriormente, fueron filtrados y medidos por HPLC enantioselectiva para determinar la concentración de cada enantiómero del plaguicida en los mismos. Adicionalmente, se analizó la cantidad total de carbono orgánico (TOC) en los lixiviados recogidos en los primeros 10 días para comprobar la posible lixiviación de materia orgánica soluble junto a los plaguicidas.

Una vez finalizado el experimento de lixiviación, en los tratamientos en los que se observó una lixiviación total de los plaguicidas menor a un 80%, se extrajo el

suelo de las columnas obteniéndose cilindros de aproximadamente 20 cm de longitud. Se cortaron en 4 porciones iguales de unos 5 cm y se extrajeron con 100 ml de metanol las columnas tratadas con metalaxil y de mezcla H_3PO_4 diluida (pH=2):acetonitrilo (60:40) aquellas en las que se adicionó imazaquín. Se agitó durante 24 horas y el sobrenadante se filtró y midió por HPLC enantioselectiva (Figura 3.10b).

3.2.4.3.2. Estudio de lixiviación con adición del complejo de SA-HDTMA y *R*-imazaquín

Para este estudio se prepararon columnas de suelo S2 de forma análoga al procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.3.1. A dichas columnas se les adicionó, por triplicado, una dosis de 0.2 kg/ha de *rac*-imazaquín en disolución acuosa, 0.1 kg/ha de *R*-imazaquín también en disolución acuosa y esta misma dosis de *R*-imazaquín en forma de complejo con la arcilla SA-HDTMA. A continuación se desarrolló el experimento de lixiviación del mismo modo que en el apartado 3.2.4.3.1.

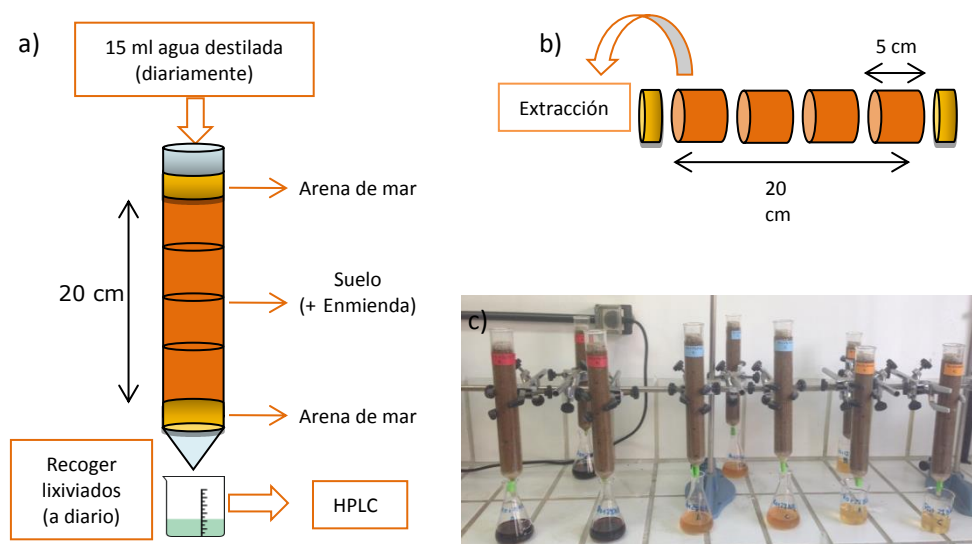


Figura 3.10. Esquema de las columnas de suelo utilizadas para los experimentos de lixiviación (a), y de la separación del contenido de la columna para realizar la extracción (b). Fotografía de las columnas de suelo durante el estudio de lixiviación (c).

3.2.4.4. Bioensayos con imazaquín

Se realizaron dos tipos de bioensayos con imazaquín. El primero de ellos fue un bioensayo general para evaluar la eficacia biológica de los enantiómeros del herbicida por separado, a tres dosis de aplicación diferentes. Por otro lado, se realizó un segundo bioensayo con simulación de un periodo de intensa lluvia poco después de la aplicación del herbicida. Con ello, se comprobó la posible reducción de las pérdidas de imazaquín en esta situación de alto riesgo de lixiviación cuando el herbicida se aplicó en forma de complejo con la arcilla SA-HDTMA.



Figura 3.11. Foto de las macetas empleadas en los bioensayos.

3.2.4.4.1. Bioensayo general

Los bioensayos se realizaron por triplicado en macetas de 30 cm² de superficie y 5 cm de altura (Figura 3.11). Se dispuso en el fondo de la maceta lana de vidrio y se cubrió con 30 g de arena de mar de grano grueso. A continuación se añadió 100 g del suelo S2 y las macetas se saturaron con 100 ml de agua destilada. Tras 24 horas, se plantaron en cada maceta 12 semillas de Brócoli Romanesco Natalino (*Brassica oleracea botrytis*) y, seguidamente, se aplicó el plaguicida a tres dosis diferentes (1, 2 y 5 g/ha) de cada enantiómero por separado. Asimismo, se prepararon 3 macetas control a las cuales, tras plantar las semillas, no se aplicó el herbicida. Las macetas se regaron diariamente con agua destilada durante 2 semanas, tras las cuales, para determinar la eficacia biológica de cada enantiómero del herbicida, se extrajeron las plantas de la maceta y se midió la longitud de tallo y de la raíz de cada planta. Finalmente, se pesó la parte aérea de todas las plantas germinadas de cada maceta para calcular la biomasa.

3.2.4.4.2. Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación

En este bioensayo, se utilizaron macetas de 36 cm² de área y 5 cm de altura. Se colocó lana de vidrio en el fondo de la maceta, se cubrió con 60 g de arena de mar de grano grueso y se añadió 100 g de suelo S2 a cada una de ellas. Se aplicó el herbicida como *rac*-imazaquín a una dosis de 80 g/ha y como *R*-imazaquín en forma libre y de complejo con SA-HDTMA a una dosis de 40 g/ha. Todas las aplicaciones se realizaron por triplicado. Tras aplicar el plaguicida en sus diferentes formas, se adicionó 150 ml de agua destilada a cada maceta (equivalente a una lluvia de 40 l/m²), se dejó lixiviar 24 horas y se recogió el lixiviado para un posterior análisis por HPLC enantioselectiva. A continuación, se plantaron 12 semillas de Brócoli Romanesco Natalino (*Brassica oleracea botrytis*) en las macetas, se colocaron a la luz solar y se regaron diariamente con agua destilada. Pasadas 2 semanas, se extrajeron las plantas de las macetas y se midió la longitud de los tallos y de la raíz. Finalmente se pesó la parte aérea de las plantas germinadas para calcular la biomasa.

3.2.5. Estudio del comportamiento enantioselectivo del metalaxil en un suelo agrícola bajo condiciones reales de campo: efecto de la adición de arcilla modificada

Se diseñó un experimento en condiciones de campo con el fin de comparar el comportamiento del metalaxil en suelo sin enmendar y enmendado con arcilla bajo condiciones ambientales reales. Dicho experimento de campo se realizó en parcelas de la finca experimental “La Hampa” que el IRNAS (CSIC) posee en la localidad de Coria del Río en Sevilla (37° 17' 02'' N, 6° 03' 58'' W). Se prepararon seis parcelas de 1 m² confinadas en marcos de madera con una altura de 10 cm y con una separación entre parcelas de 0.5 m. Tres de las parcelas se enmendaron manualmente con la arcilla HT-OLE a una dosis de 2 t/ha en la parte más superficial del suelo (0-2 cm) y las otras tres parcelas se dejaron sin enmendar. En la Figura 3.12a se muestra una fotografía de una de las parcelas durante el tratamiento con la arcilla. A continuación, se aplicó el metalaxil a una dosis de 6 kg/ha disuelto en 4 l de agua a todas las parcelas. Dicha aplicación tuvo lugar el 8 de octubre de 2014. Las condiciones atmosféricas (lluvias y temperatura del aire) fueron monitorizadas durante la duración del experimento en una estación meteorológica localizada a unos 4 km del lugar de estudio. Se tomaron muestras por triplicado y a diferentes profundidades (0-5, 5-10 y 10-20 cm) con barrena en los días 0, 35, 64 y 98 tras la aplicación del fungicida (Figura

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.12b). Las muestras tomadas se guardaron en bolsas de plástico y se congelaron inmediatamente a -20°C . Para la extracción, se tomaron por duplicado 5 g del suelo almacenado en cada bolsa, se le añadió 10 ml de metanol y se agitó durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugó y los sobrenadantes se filtraron y midieron por HPLC enantioselectivo. Experimentos previos demostraron que este procedimiento de extracción recuperaba más del 95% del metalaxil añadido al suelo. Además, 35 días después de la aplicación, se tomaron alícuotas de suelo enriquecido con arcilla que se extrajeron para determinar su contenido en metalaxil y compararlo con el contenido medio del suelo en su conjunto (Figura 3.12c).



Figura 3.12. Fotografías de una de las parcelas utilizadas en los experimentos de campo (a) y del muestreo de los suelos de dichas parcelas con barrena a diferentes profundidades (b). Imagen de la acumulación de organo-arcilla en los 5 primeros cm del suelo en las parcelas enmendadas (c).

3.2.6. Tratamiento de los datos

Los datos de adsorción, persistencia, lixiviación y bioeficacia se obtuvieron, al menos, por duplicado y los resultados se expresaron como la media acompañada del error estándar para indicar la variabilidad entre las repeticiones. Para la identificación de diferencias significativas entre tratamientos se aplicó ANOVA de un factor, seguido del test Tukey ($p = 0.05$) utilizando el programa Sigma Plot versión 12.5. El ajuste de las isothermas a la ecuación de Freundlich y de los datos de disipación a una cinética de primer orden también se llevó a cabo utilizando el programa Sigma Plot versión 12.5.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. CARACTERIZACIÓN DE SUELOS Y ADSORBENTES

4.1.1. Caracterización de los suelos

Las principales propiedades de los suelos utilizados en los experimentos de este trabajo se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características físico-químicas de los suelos empleados. AR: arena; L: limo; A: arcilla; C.O.: carbono orgánico oxidable; C.E.: conductividad eléctrica.

Suelo	Textura	AR	L	A	CaCO ₃	C.O.	pH	C.E.
		----- % -----						-- mS/cm --
S1	Arcillosa	6	26	68	1.6	0.48	8.6	0.190
S2	Franco-arenosa	74	4	22	2.5	0.50	8.8	0.093
S3	Franco-arenosa	66	16	18	18.9	0.59	7.4	0.143

Los suelos utilizados en los experimentos de laboratorio (S1 y S2) presentan un pH alcalino, mientras que el valor del pH del suelo de las parcelas del experimento de campo (S3) es cercano a la neutralidad. Todos los suelos presentan un % de C orgánico bajo, lo cual es característico de los suelos mediterráneos. Cabe destacar el alto contenido de carbonatos presente en el suelo S3 comparado con los otros dos suelos y que todos los suelos presentaron un bajo contenido en Fe₂O₃ extraíble con oxalato (< 1%).

La mineralogía de la fracción arcilla se determinó por el método de Brown (1961) a partir de los difractogramas de dicha fracción sometida a diferentes tratamientos. Se calculó el contenido relativo de esmectitas, illita y caolinita en la fracción arcilla, así como el porcentaje absoluto de cada filosilicato en los suelos completos, asumiendo que la fracción arcilla estaba constituida mayoritariamente por los filosilicatos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Porcentajes relativos y absolutos de los filosilicatos presentes en los suelos. S: esmectita; I: illita/mica; K: caolinita.

Suelo	Porcentaje relativo (%)			Porcentaje absoluto (%)		
	S	I	K	S	I	K
S1	28	57	15	19	39	10
S2	52	19	29	12	4	6
S3	88	7	5	16	1	1

Los datos de la Tabla 4.2 muestran una mayor cantidad de esmectitas en la fracción arcilla de los suelos franco-arenosos (S2 y S3). Sin embargo, al multiplicar el porcentaje relativo por la cantidad de arcilla presente en estos suelos, las cantidades de esmectitas disminuyen considerablemente. En el caso del suelo S1, se observa un predominio del filosilicato ilita, así como un alto contenido en esmectita.

Para completar la caracterización de los suelos S1 y S2, se realizaron medidas de porosimetría por intrusión de mercurio. La Figura 4.1 muestra las gráficas de las distribuciones de tamaño de poro obtenidas para los suelos, en las que las barras indican la contribución del intervalo de radio de poro correspondiente a la curva de volumen de poros acumulado durante la medición. En el caso del suelo S1, se observan dos máximos de la distribución del volumen relativo, uno a un tamaño de poro del orden de 100 μm y otro a un tamaño de poro de 0.01 μm , que puede asignarse a la porosidad resultante de la agregación de partículas de arcilla, muy abundantes en este suelo. En el suelo S2, los picos de la distribución del volumen relativo están desplazados hacia los macroporos, concentrándose principalmente en el rango 10-100 μm aproximadamente. Se observa que este suelo presenta un volumen relativo para tamaños menores de 10 μm muy escaso y homogéneo. Estos resultados coinciden con publicaciones anteriores que relacionan la textura de los suelos con la distribución de tamaños de poro. Así, suelos con textura más fina (S1) presentan un predominio de poros de volumen mediano o pequeño, mientras que en aquellos con textura gruesa (S2) se observa un incremento de poros de mayor tamaño (Cox et al., 1994; Chung & Alexander, 1999; Aichberger et al., 2006).

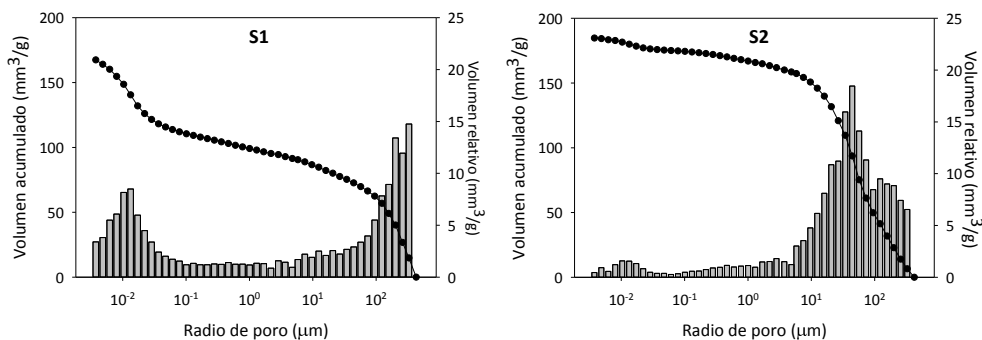


Figura 4.1. Distribución de tamaño de poro de los suelos S1 y S2 obtenida por intrusión de mercurio.

4.1.2. Caracterización de los adsorbentes

4.1.2.1. Caracterización de las enmiendas orgánicas

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de la caracterización de los residuos de almazara. Se observa que el ALPc presentó un pH más alcalino y un valor de materia orgánica menor que el ALP fresco. El aumento del pH se atribuye a la degradación parcial de la fracción de sustancias fenólicas solubles en agua y lípidos, los cuales son los responsables de la acidez y de la fitotoxicidad del alperujo (Alburquerque et al., 2006). Por otro lado, la disminución del porcentaje de C orgánico total es debido, además de a dicha degradación de materia orgánica lábil, a la mezcla del residuo con restos de poda que, aunque proporcionan materia orgánica, también pueden suministrarle ciertas impurezas como restos de suelo. Al pirolizar el ALPc a una temperatura de 400 °C, se obtuvo un residuo (BC) con un valor de humedad y carbono orgánico inferior, así como un pH aún más alcalino. Esto se debe a que al pirolizar el ALPc se elimina agua y parte del carbono orgánico presente.

Tabla 4.3. Parámetros analizados para las muestras sólidas de alperujo (ALP), alperujo compostado (ALPc) y biochar (BC).

Parámetro	ALP	ALPc	BC
Humedad (%)	6	6	2
pH	5.4	8.6	9.8
Conductividad (mS/cm)	8.0	5.9	8.9
Cenizas a 540 °C (%)	8.8	44.5	58.4
C orgánico total (%)	44	29.1	23.4
Materia orgánica (%)	91.2	55.5	41.6
N Kjendahl (%)	1.25	2.13	1.50

Debido al importante papel de la materia orgánica soluble (MOS) en el movimiento de los plaguicidas en el suelo, sobre todo en su lixiviación, se realizó un estudio más profundo del tipo de compuestos orgánicos que constituían la MOS de las enmiendas orgánicas seleccionadas. En la Figura 4.2 se muestran los espectros de fluorescencia de la MOS de las tres enmiendas. El ALP presentó un máximo de emisión en la región de los 300 – 320 nm. En este rango de longitudes de onda emiten las moléculas de menor peso molecular, polares y no humificadas. En el caso del BC emitió a longitudes de onda entre 380 - 400 nm aproximadamente, y el ALPc a longitudes de onda superiores a 420 nm. En esta zona del espectro fluorescen moléculas mayores y más complejas, probablemente aromáticas, típicas del material humificado. Los resultados obtenidos en los espectros de fluorescencia son análogos a los obtenidos por García-Jaramillo et al. (2014) para unos residuos orgánicos similares a los utilizados en este trabajo.

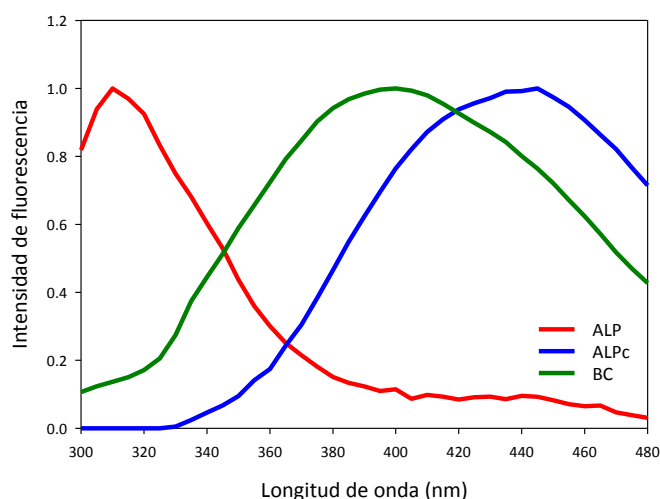


Figura 4.2. Espectros de fluorescencia normalizados al máximo de emisión para la MOS extraída de ALP, ALPc y BC.

A partir de los espectros de fluorescencia se determinó el índice de humificación (IH) aplicando la Ec. 3.1. Los resultados obtenidos, junto con los valores de algunas características determinadas para los extractos de las enmiendas orgánicas, se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Características de los extractos de MOS de los residuos orgánicos utilizados como adsorbentes: pH, carbono orgánico soluble de los residuos (C.O.) e índice de humificación (IH).

	pH	C.O. (mg/l)	IH
ALP	5.3	3800	0.1
ALPc	8.3	420	9.5
BC	9.4	190	2.6

Los valores de pH de los extractos (medidos en CaCl_2 0.01 M) fueron similares a los obtenidos para las suspensiones acuosas de los residuos. El porcentaje de carbono orgánico fue muy superior en el caso del ALP, y fue disminuyendo tras los proceso de compostaje y pirólisis a 400 °C. Finalmente, los valores de índice de humificación confirmaron el orden creciente de humificación observado en los espectros (Figura 4.2): $\text{ALP} < \text{BC} < \text{ALPc}$.

El incremento del índice de humificación está relacionado con una mayor complejidad de las moléculas presentes en el residuo orgánico, por ejemplo, por un aumento en el número de anillos aromáticos, en el grado de condensación y/o conjugación, así como en la relación C/H (Zsolnay, 2003). De este modo, el bajo valor de IH del ALP se puede justificar por la presencia de compuestos lábiles, sencillos y poco humificados. El aumento del índice de humificación tras el proceso de compostaje del ALP se puede atribuir a la transformación microbológica de dicha materia orgánica lábil en compuestos orgánicos más complejos, así como a la presencia de compuestos recalcitrantes que han resistido la biodegradación. La disminución del IH en el extracto de BC pudo ser consecuencia de la eliminación de moléculas complejas del ALPc al ser sometido a la pirólisis. Así, se obtiene un residuo constituido, principalmente, por compuestos condensados no solubles en agua y en el que la cantidad de compuestos recalcitrantes que no se degradaron en el compostaje se ha reducido parcialmente.

4.1.2.2. Caracterización de las arcillas

4.1.2.2.1. Hidrotalcitas

a) Análisis elemental

Los resultados obtenidos del análisis elemental de las organo-hidrotalcitas utilizadas en los diferentes experimentos, junto con los de sus arcillas de partida HT-CO₃ y HT₅₀₀, se recogen en la Tabla 4.5. Teniendo en cuenta la fórmula general de los compuestos tipo hidrotalcita: $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x(OH)_2]^{x+} [A^{n-}]_{x/n} \cdot mH_2O$, la relación atómica de los elementos metálicos vendrá dada por la siguiente expresión:

$$\frac{M^{II}}{M^{III}} = \frac{(1-x)}{x} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Tabla 4.5. Resultados del análisis elemental de los adsorbentes tipo hidrotalcita.

	Masa (%)				Relaciones atómicas			
	Mg	Al	C	N	x	Mg/Al	C/Al	Anión/Al
HT-CO ₃	24.0	8.5	2.2	< 0.05	0.24	3.1	0.6	0.58
HT ₅₀₀	38.6	13.7	0.9	< 0.05	0.24	3.1	0.1	0.14
HT-ELA	12.2	4.3	39.1	< 0.05	0.24	3.1	20.5	1.14
HT-CO ₃ (Sigma)	22.2	11.3	5.1	< 0.05	0.31	2.2	1.0	1.01
HT ₅₀₀ (Sigma)	38.9	19.6	0.8	< 0.05	0.31	2.2	0.1	0.09
HT-OLE	16.7	7.1	30.2	< 0.05	0.28	2.6	9.6	0.53

El valor de x representa la carga generada por la sustitución isomórfica del catión divalente (Mg⁺²) por el catión trivalente (Al⁺³), la cual debe ser compensada por el anión interlaminar. Para la hidrotalcita no modificada (HT-CO₃ y HT-CO₃ Sigma), si toda la carga positiva originada por la incorporación de Al estuviera compensada por el anión interlaminar (CO₃²⁻), la relación teórica Anión/Al sería 0.5. Sin embargo, el

valor obtenido para dicha relación a partir de los datos experimentales de HT-CO₃ es de 0.6 (Tabla 4.5). Esto supone un exceso del 20% de anión carbonato que estará, probablemente, adsorbido en la superficie externa de la hidrotalcita debido a la alta afinidad de este anión por la lámina (Miyata, 1983). La relación Anión/Al para la hidrotalcita calcinada (HT₅₀₀) disminuyó a un valor de 0.1 debido a que, durante el proceso de calcinación a 500° C, el carbonato interlamilar se pierde en forma de CO₂. No obstante, una cantidad residual de C continúa presente en la HT₅₀₀, probablemente debido a incorporación de CO₂ atmosférico. En el caso de la hidrotalcita de partida comercial (HT-CO₃ Sigma) se observan ciertas diferencias respecto a la hidrotalcita sintética. En primer lugar, la relación Mg/Al tiene un valor cercano a 2 en lugar del esperado de 3 para una hidrotalcita del tipo 3:1. Además, la relación Anión/Al es 1.0 en lugar del valor teórico de 0.5. Esto puede ser indicativo de que la hidrotalcita comercial podría contener impurezas en las que parte del aluminio está en forma de carbonato, sin formar parte de la lámina de hidróxido doble.

Las organo-hidrotalcitas presentaron un valor experimental de C/Al considerablemente más alto que el de sus correspondientes hidrotalcitas no modificadas, debido a la incorporación de los ácidos grasos (ELA y OLE) en el espacio interlamilar. Asumiendo que el C analizado corresponde casi en su totalidad a los ácidos grasos (en el apartado 4.1.2.2.1c se demostrará por IR la ausencia de cantidades importantes de carbonatos en las muestras de organo-hidrotalcita) es posible calcular la cantidad de anión orgánico intercalado por unidad de carga de la arcilla. De este modo, para la muestra HT-ELA se obtuvo una relación Anión/Al ligeramente superior a 1. Esto nos indica que se ha producido una completa incorporación del anión elaidato durante el proceso de reconstrucción. El exceso de anión orgánico detectado en esta organo-hidrotalcita puede deberse a que en el proceso de reconstrucción se añadió una cantidad levemente superior a la capacidad de intercambio aniónico de la hidrotalcita de partida, que pudo quedar adsorbido a través de interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, la relación Anión/Al para la muestra HT-OLE fue de 0.52, menor a lo esperado teóricamente. Esto puede ser consecuencia de dos efectos: (i) la presencia de impurezas de ácidos grasos de menor peso molecular que el oleato (palmítico, mirístico...) que neutralizan la carga del aluminio pero cuyo contenido en carbono es menor; o bien a que, como se ha comentado anteriormente, (ii) parte del aluminio puede estar en forma de carbonato en una fase que no adsorbe oleato.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los datos experimentales obtenidos del análisis elemental y considerando una estructura tipo hidrotalcita, $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2$, u óxido mixto, $Mg_{1-x}Al_xO_{1+x/2}$, se propusieron las fórmulas moleculares que se resumen en la Tabla 4.6 para cada uno de los compuestos.

Tabla 4.6. Fórmulas moleculares propuestas para las muestras de hidrotalcita y organo-hidrotalcitas.

Muestras	Fórmula molecular
HT-CO ₃	$Mg_{0.76}Al_{0.24}(OH)_2(CO_3)_{0.14}$
HT ₅₀₀	$Mg_{0.76}Al_{0.24}O_{0.12}$
HT-ELA	$Mg_{0.76}Al_{0.24}(OH)_2(ELA)_{0.27}$
HT-CO ₃ Sigma	$Mg_{0.69}Al_{0.31}(OH)_2(CO_3)_{0.31}$
HT ₅₀₀ Sigma	$Mg_{0.69}Al_{0.31}O_{1.15}$
HT-OLE	$Mg_{0.72}Al_{0.28}(OH)_2(OLE)_{0.15}$

b) Difracción de rayos X

En la Figura 4.3 se muestran los difractogramas de las dos organo-hidrotalcitas sintetizadas junto con los de sus correspondientes hidrotalcitas no modificadas (HT-CO₃) e hidrotalcitas calcinadas (HT₅₀₀) utilizadas como materiales de partida para su síntesis.

- Hidrotalcitas no modificadas (HT-CO₃ y HT-CO₃ Sigma): En el diagrama de la muestra HT-CO₃ se observan difracciones intensas, estrechas y simétricas a valores bajos de 2θ y difracciones de menor intensidad, más anchas y asimétricas a valores de 2θ elevados, lo cual es un patrón característico de los hidróxidos dobles laminares bien cristalizados (Donato et al., 2012). En este difractograma aparecen las difracciones correspondientes a los planos (003), (006) y (009) con valores de espaciado de 7.73, 3.87 y 2.60 Å, respectivamente. Estos valores concuerdan con la presencia de carbonato en la interlámina como principal anión interlaminar (Barriga et al., 2002; Costa et al., 2008; Donato et al., 2012). A partir del espaciado d_{003} , es posible determinar el parámetro c como $c = 3d_{003}$, resultando un valor de $c = 23.19$ Å. Asimismo, es posible calcular la distancia entre láminas (h) como la diferencia entre el espaciado del plano 003 y el espesor de la capa de brucita (4.8 Å), obteniéndose $h = 2.93$ Å. La distancia media metal-metal (parámetro a) puede determinarse a partir del pico de difracción (110) como $a = 2d_{110}$, obteniéndose un valor de 3.06 Å. Esta distancia concuerda con los valores esperados para hidrotalcitas de Mg:Al con una relación (3:1) (Miyata, 1980; Cavani et al., 1991).

El diagrama de difracción para la hidrotalcita comercial (HT-CO₃ Sigma) es prácticamente idéntico al de la muestra sintética, presentando las mismas difracciones con una intensidad similar. No obstante, cabe destacar pequeñas diferencias debido a la presencia ciertas impurezas de Al. Así, se observan dos pequeños picos a ángulos $2\theta = 53^\circ$ y $2\theta = 56^\circ$ que podrían asignarse a impurezas de Al (carbonatos o hidróxidos).

- Hidrotalcitas calcinadas (HT₅₀₀ y HT₅₀₀ Sigma): Los espectros de difracción de ambas muestras calcinadas son prácticamente iguales. Se observa la desaparición de los picos de difracción de mayor intensidad y mayor espaciado, correspondientes a los planos (003) y (006). Esto se atribuye a la pérdida de los aniones CO₃²⁻ durante la calcinación y a la destrucción de la estructura laminar. Por otro lado, el diagrama

presenta dos difracciones anchas correspondientes a los planos (200) y (220) típicas de la estructura cúbica tipo MgO de las hidrotalcitas calcinadas (Barriga et al., 2002).

- Organo-hidrotalcitas (HT-ELA y HT-OLE): Los difractogramas de las organo-hidrotalcitas muestran una menor cristalinidad a la observada en las hidrotalcitas no modificadas. Esto es consecuencia de que la incorporación de los aniones orgánicos durante el proceso de reconstrucción ha dificultado el proceso de reordenamiento de las láminas. Al rehidratarse la hidrotalcita calcinada con las disoluciones de elaidato u oleato, los picos correspondientes a d_{003} y d_{006} de la hidrotalcita vuelven a aparecer, pero con menor intensidad. La presencia de estos picos puede deberse a la existencia de una pequeña fracción de hidrotalcita no modificada o a reflexiones de alto orden (00l) (Costa et al., 2008). El valor del espaciado del plano (110) es el mismo que en la HT-CO₃, lo cual nos indica que el valor del parámetro a es la mismo. Esto supone que las organo-hidrotalcitas mantienen la estructura doble laminar propia de los compuestos tipo hidrotalcita con una misma distancia media catión-catión. La principal variación entre los difractogramas de las organo-hidrotalcitas con los de sus correspondientes arcillas sin modificar y entre sí es el valor del espaciado basal. En el caso de HT-ELA, se midió el difractograma a bajo ángulo y se observó la aparición de dos picos: uno a 35.3 Å y otro a 50.4 Å. Estudios anteriores (Xu et al., 2004; Celis et al., 2014) han relacionado el valor de ≈ 36.0 Å al espaciado basal de un ordenamiento de la organo-hidrotalcita en el que los aniones orgánicos se disponen con un ángulo de inclinación de aproximadamente 60° sobre las láminas de HT dando lugar a una monocapa. Por otro lado, el pico de difracción de 50.4 Å puede asignarse a una interlámina en la que el anión elaidato y el ácido eláidico se colocan sucesivamente sobre la lámina de HT con un ángulo de $\approx 60^\circ$ formando una bicapa (Xu et al., 2004; Donato et al., 2012). En el caso del difractograma correspondiente a la muestra HT-OLE, se observa un espaciado de 34 Å, un valor próximo al obtenido en estudios previos de hidrotalcita con oleato intercalado en su estructura (Xu et al., 2004; Celis et al., 2014).

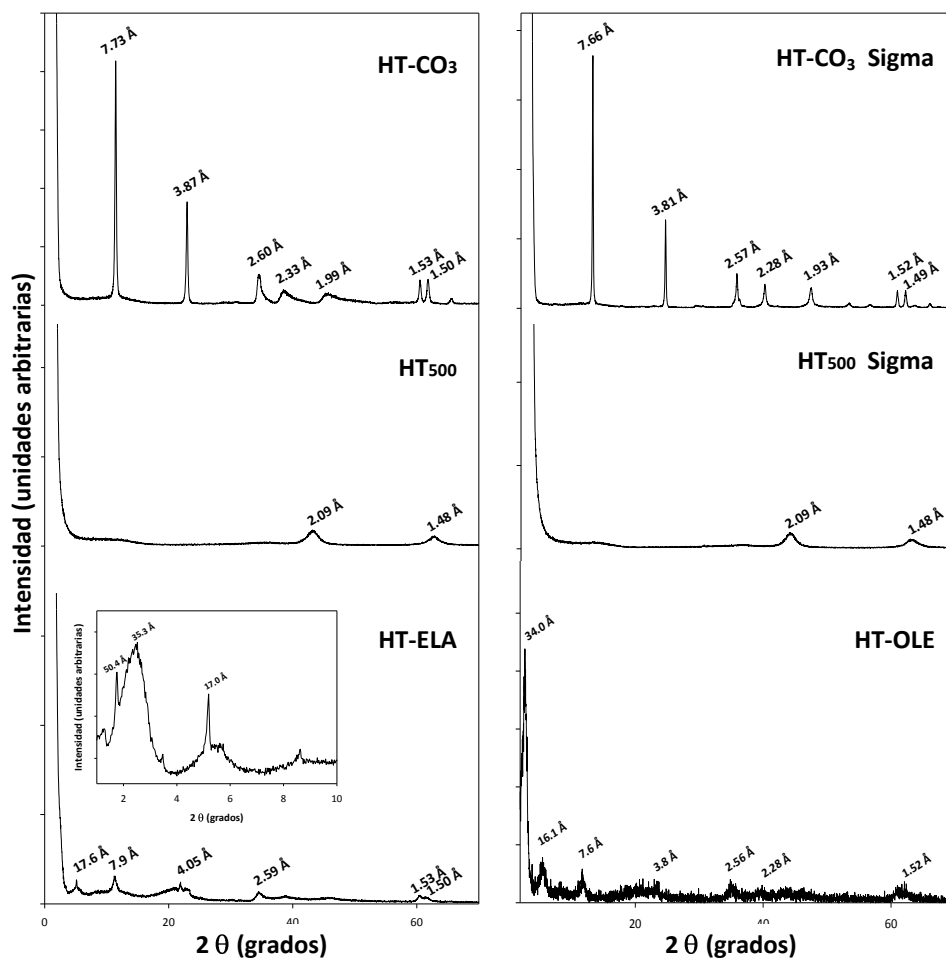


Figura 4.3. Difractogramas de rayos X de las muestras de hidrotalcita (HT-CO₃ y HT-CO₃ sigma), de hidrotalcita calcinada (HT₅₀₀ y HT₅₀₀ Sigma) y de las organo-hidrotalcitas (HT-ELA y HT-OLE).

c) Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier

En la Figura 4.4 se han representado los espectros de infrarrojos de las hidrotalcitas no modificadas, las hidrotalcitas calcinadas y las organo-hidrotalcitas.

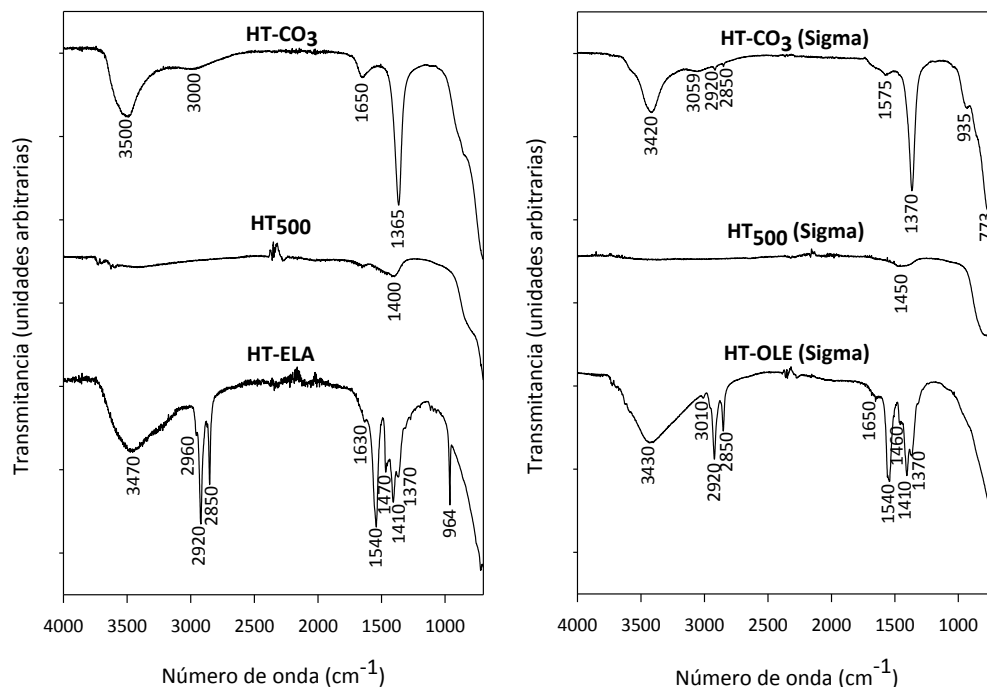


Figura 4.4. Espectros de infrarrojos de las hidrotalcitas carbonatadas (HT-CO₃ y HT-CO₃ Sigma), calcinadas (HT₅₀₀ y HT₅₀₀ Sigma) y modificadas con aniones orgánicos (HT-ELA y HT-OLE).

- Hidrotalcitas carbonatadas (HT-CO₃ y HT-CO₃ Sigma): El espectro de la hidrotalcita HT-CO₃ presenta las bandas de absorción propias de un hidróxido doble laminar Mg:Al con iones carbonato en su estructura. Así, en el espectro se observa una banda ancha a 3500 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de tensión de los grupos hidroxilos estructurales y del agua adsorbida, y una banda a 1650 cm⁻¹ de la vibración de deformación de dichas moléculas de agua. Se aprecia un hombro pequeño cercano a 3000 cm⁻¹ que se puede asignar a moléculas de agua que están fuertemente unidas a los aniones carbonato presentes en la interlámina. A números de onda inferiores, se obtiene una banda muy intensa correspondiente al modo de vibración de tensión U₃

del ion carbonato a 1365 cm^{-1} . Este valor difiere ligeramente del valor de absorción del grupo carbonato libre (1415 cm^{-1}) debido, probablemente, a la interacción de los grupos carbonatos con el espacio interlaminar. Por debajo de los 1000 cm^{-1} se observarían los modos de tensión U_2 y U_4 de los carbonatos, así como las vibraciones Mg-O y Al-O. La muestra de HT-CO₃ Sigma presenta un espectro muy similar al obtenido para la HT-CO₃, excepto por dos pequeñas bandas a 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} correspondientes a ciertas impurezas presentes en la hidrotalcita comercial, probablemente algún tipo de compuesto orgánico. Otra diferencia es el desplazamiento de la banda de vibración de hidroxilos a menor número de onda. Esto puede deberse a la presencia de mayor cantidad de aluminio en la muestra, que debilita los enlaces O-H.

- Hidrotalcitas calcinadas (HT₅₀₀ y HT₅₀₀ Sigma): Los espectros de infrarrojos de las hidrotalcitas calcinadas muestran cómo el proceso de calcinación eliminó casi en su totalidad el agua adsorbida y los carbonatos de la interlámina. También se observa la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de los grupos hidroxilos fuertemente unidos a aniones carbonato (3000 cm^{-1}), todo ello al transformarse las hidrotalcitas en óxidos mixtos y perder su estructura laminar. Los pequeños hombros observados a número de onda 3400 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} pueden atribuirse a pequeñas cantidades de agua y carbonato adsorbidas por las muestras calcinadas al entrar en contacto con el aire.

- Organo-hidrotalcitas (HT-ELA y HT-OLE): Tras la hidratación de la hidrotalcita calcinada con la disolución de elaidato, se produjo la recuperación de la estructura laminar, lo cual se confirma por la presencia de bandas propia de los grupos hidroxilos estructurales y moléculas de agua adsorbidas U_{OH} y δ_{H-OH} (3470 cm^{-1} y 1630 cm^{-1}). Excepto un pequeño hombro a 1370 cm^{-1} que puede atribuirse a una pequeña cantidad residual de carbonatos que ocupan sitios de adsorción de la hidrotalcita, se observa la desaparición de las bandas asociadas a los carbonatos, lo cual nos indica que la incorporación del anión orgánico en la interlámina ha sido efectiva. En el espectro de HT-ELA, se observan las bandas de la cadena carbonada del elaidato: vibraciones de tensión de los grupos $-CH_2-$ y $-CH_3$ a 2960 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} (U_{CH} asimétrica) y 2920 cm^{-1} (U_{CH} simétrica), una banda correspondiente a las vibraciones de flexión a 1470 cm^{-1} (δ_{CH}) y un hombro pequeño a 1370 cm^{-1} que, además de a carbonato residual, también puede corresponder a flexiones de grupos CH_2 y CH_3 . A

1540 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} , se identifican las tensiones de los grupos COO^- asimétrica y simétrica respectivamente. La presencia de estas bandas, junto con la ausencia de las bandas correspondientes a vibraciones de tensión de los C=O de los grupos carboxílicos protonados, nos indica que existe un predominio de la forma ionizada del ácido eláidico en la interlámina, que interaccionará a través de puentes de hidrógeno con los grupos OH de las láminas de arcilla. Esta fuerte interacción entre los OH de las láminas y los grupos COO^- también podría ser la responsable del ligero desplazamiento de la banda de tensión U_{OH} a números de onda menores observada en el espectro de la HT-ELA cuando se compara con el espectro de la hidrotalcita original. Finalmente, cabe destacar la banda a 964 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de deformación fuera del plano de los grupos C-H unidos por un doble enlace en *trans* presentes en el elaidato.

El espectro de HT-OLE presenta las principales bandas descritas para la muestra HT-ELA. Sin embargo se observan ciertas diferencias. Por una parte, se aprecia una pequeña banda a un número de onda de 3010 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión de los grupos C-H adyacentes a los dobles enlaces en *cis* del anión oleato. Asimismo, se observa la ausencia de la banda a 964 cm^{-1} presente en el espectro de HT-ELA, la cual se asignó a la disposición *trans* del doble enlace del elaidato.

d) Resonancia magnética nuclear

En la Figura 4.5 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN de la muestra HT-ELA. Dicho espectro presenta los picos típicos correspondientes al anión elaidato. A un valor de desplazamiento químico de 184 ppm se obtiene la señal del C del grupo carboxilato y a 131 ppm se observa la de los C que intervienen en el doble enlace. En el rango de 10-40 ppm aparecen los picos correspondientes a los C de la cadena carbonada. Así, a 15 ppm se encuentra el pico de CH_3 , a 24 ppm la señal de los C unidos a los CH_3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), a 27 ppm está la señal de $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ y a 31 ppm se obtiene una señal muy intensa de los C de los grupos CH_2 de la cadena alifática. Finalmente, cabe destacar la presencia de un par de señales a un desplazamiento químico de 34 ppm aproximadamente, correspondiente a un C adyacente a un C que interviene en un doble enlace en *trans* y un pico a 39 ppm de los C unidos al C carboxílico ($\text{CH}_2\text{-COOH}$).

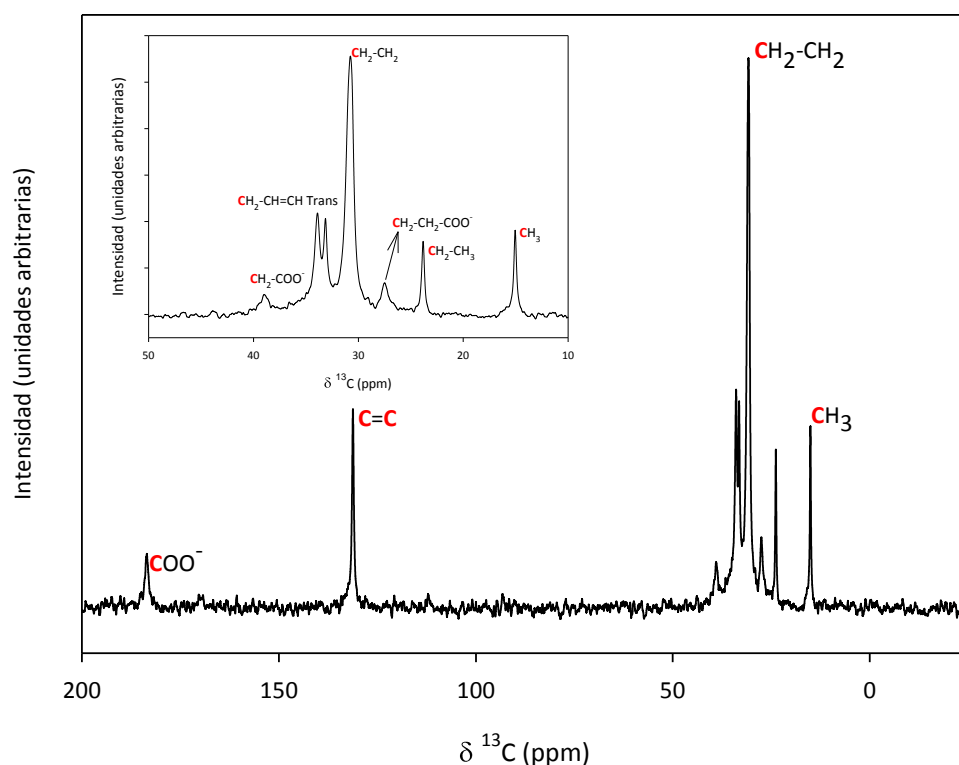


Figura 4.5. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (estado sólido) de la muestra de HT-ELA.

Además del espectro de ^{13}C -RMN, se midió el espectro de ^1H -RMN, el cual se presenta en la Figura 4.6. En el intervalo de desplazamiento químico de 1 a 2.5 ppm aproximadamente, se observan las bandas correspondientes a los H de los grupos alquílicos de la cadena carbonada. A un desplazamiento mayor, 5.5 ppm, se obtiene la señal de los grupos H unidos a los C del doble enlace. Se advierte la ausencia de una banda a un desplazamiento de aproximadamente 11 ppm que correspondería a los H de los grupos carboxílicos, lo cual es indicativo de que existe un predominio de la forma de anión elaidato frente al ácido eláidico en la interlámina.

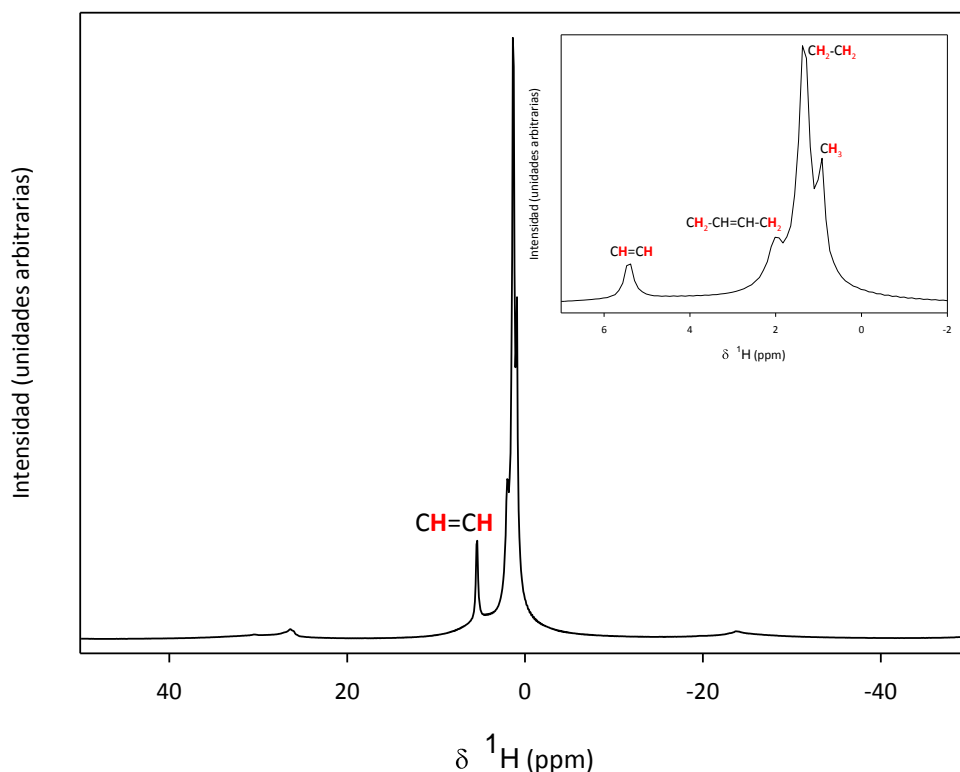


Figura 4.6. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H (estado sólido) de la muestra de HT-ELA.

e) Modelización de las estructuras de las organo-hidrotalcitas

A partir de los datos obtenidos en la caracterización, se puede proponer una estructura para la muestra HT-ELA asumiendo una disposición en la que el anión elaidato adopta una inclinación de unos 60° al interaccionar con las láminas de la hidrotalcita (Figura 4.7a). Esta inclinación permite la interacción del grupo carboxilato con la superficie del hidróxido doble laminar a través de los dos átomos de O, situación que parece la más estable en este tipo de estructuras (Xu et al., 2004; Celis et al., 2014). Teniendo en cuenta esta inclinación, es posible calcular el grado de solapamiento entre las cadenas orgánicas adyacentes, S (Å), con la siguiente expresión:

$$h = d_{003} - 4.8 = (2L - S) \cdot \text{Sen } \alpha \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde L (Å) es la longitud del anión interlaminar (24.5 Å en el caso de ELA) y α (grados) es el ángulo de inclinación entre la cadena orgánica y la superficie de la hidrotalcita (Figura 4.7a).

Otra posible disposición de los aniones elaidato en el espacio interlaminar es formando un empaquetamiento bilaminar o bicapa (Figura 4.7b). Según Xu et al. (2004), esta estructura presentaría un espaciado de 48.2 Å, un valor que se aproxima mucho a uno de los que aparecen en el diagrama de difracción de rayos X para nuestra muestra HT-ELA (50.4 Å). A partir de la Ec. 4.3, es posible calcular a qué distancia, D (Å), se encuentran las láminas de ácido graso entre sí, obteniéndose un valor de $D = 3.2$ Å:

$$h = d_{003} - 4.8 = (2L \cdot \text{Sen } \alpha) + D \quad \text{Ec. 4.3}$$

Esta nueva fase bicapa suele darse en los casos en los que se ha utilizado un exceso de ácido eláídico durante la reconstrucción (Xu et al., 2004). Cabe recordar, que en el análisis elemental de HT-ELA se obtuvo una relación Anión/Al de 1.14, con lo que, probablemente, ese exceso de anión orgánico se dispuso formando la bicapa.

En el caso de la hidrotalcita modificada con oleato, su disposición es diferente debido a la geometría curvada de la molécula al presentar un doble enlace en *cis*. De este modo, como se ha representado en la Figura 4.7c, las moléculas se empaquetan de forma que las cadenas alifáticas sólo se solapan parcialmente (Xu et al., 2004; Celis et al., 2014). Celis et al. (2014) indicaron la posibilidad de que las moléculas de oleato se dispusieran en conformación *gauche* en la interlámina. Esta conformación supone que las moléculas con dobles enlaces, como el oleato, adoptan una conformación más lineal y, por cada torsión, reducen la longitud de su cadena en unos 1.27 Å aproximadamente (Lagaly et al., 1977). Este empaquetamiento da lugar a una disposición de las moléculas más ordenada, con un solapamiento entre cadenas orgánicas adyacentes más eficiente, lo cual estabiliza la estructura (Figura 4.7d).

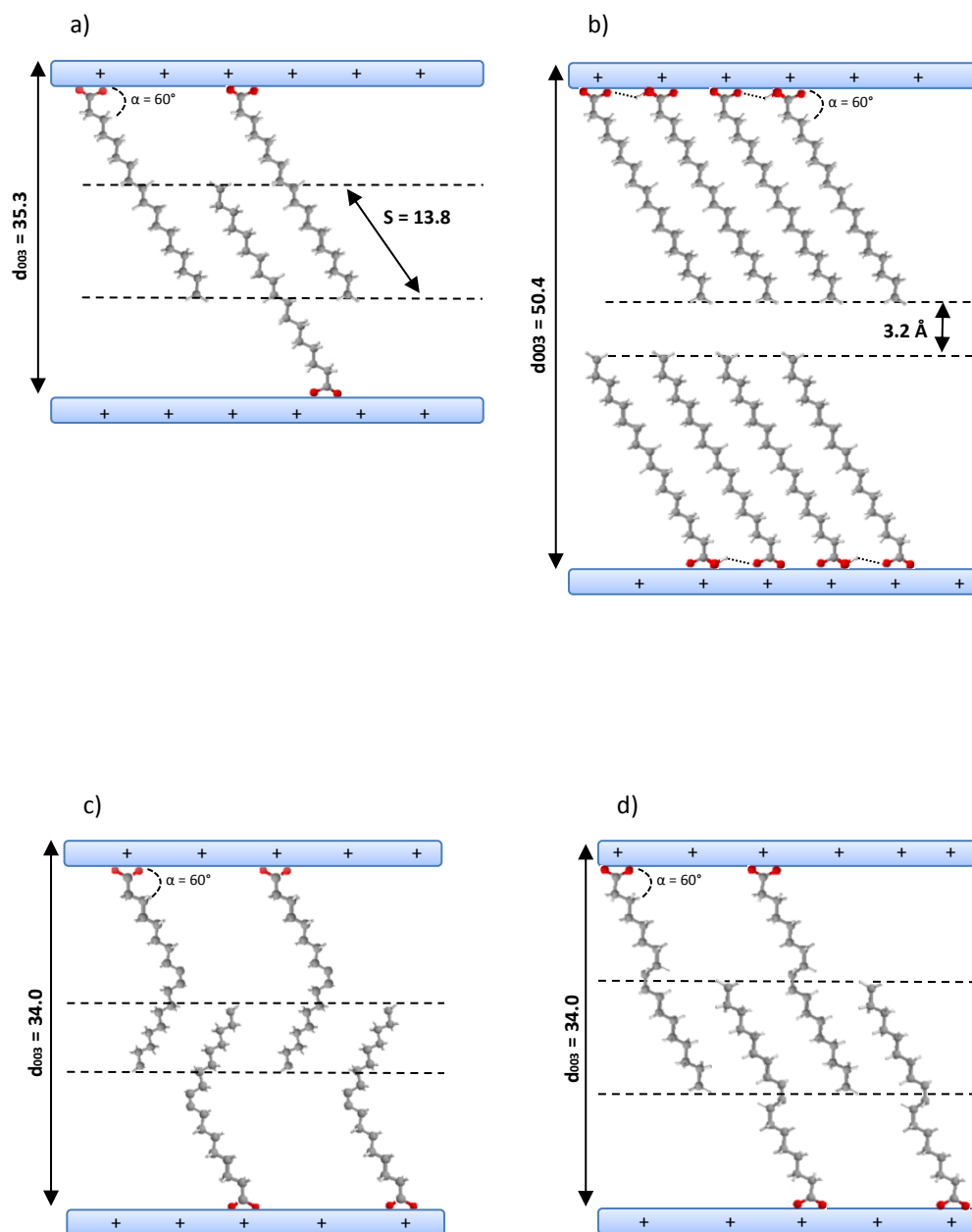


Figura 4.7. Posibles estructuras de las organohidrotalcitas HT-ELA con disposición en monocapa (a) y en bicapa (b) y de la HT-OLE en conformación *trans* (c) y conformación *gauche* (d).

4.1.2.2.2. Montmorillonita modificada con HDTMA

a) Análisis elemental

La Tabla 4.7 resume los resultados obtenidos del análisis elemental de la arcilla sin modificar (SAz-1) y de la organo-arcilla (SA-HDTMA). A partir de los contenidos de C y N obtenidos se calculó el porcentaje de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de la montmorillonita compensada por el catión orgánico (SCtO). El valor del grado de saturación en catión modificador fue del 101%, lo cual indica que los cationes HDTMA compensaron por completo la CIC de la montmorillonita SAz-1.

Tabla 4.7. Resultado del análisis elemental de la muestra de montmorillonita sin modificar y modificada.

	C (%)	N (%)	SCtO ^a
SAz-1	< 0.1	< 0.05	-
SA-HDTMA	22.14 ± 0.03	1.26 ± 0.02	101

^aSCtO: grado de saturación en catión orgánico, es decir, porcentaje de la capacidad de intercambio catiónico de la montmorillonita ocupada por cationes HDTMA.

b) Difracción de rayos X

En la Figura 4.8 se muestran los difractogramas de la montmorillonita de partida y de la montmorillonita modificada con el catión orgánico. Los valores de espaciado basal, d_{001} , están incluidos en los difractogramas.

- SAz-1: El valor del espaciado basal observado para la montmorillonita de partida fue de 15.2 Å. Este espaciado es típico de una interlamina de montmorillonita ocupada por cationes Ca^{+2} con dos capas de moléculas de agua a su alrededor (Wang et al., 2010; Gámiz et al., 2015).

- SA-HDTMA: En el caso de la montmorillonita modificada con el catión HDTMA se obtuvo un valor de $d_{001} = 22.5$ Å. Este valor de espaciado basal es característico de una estructura parafínica, es decir, vertical del HDTMA en la región interlamina (Jaynes & Boyd, 1991b; Gámiz et al., 2015).

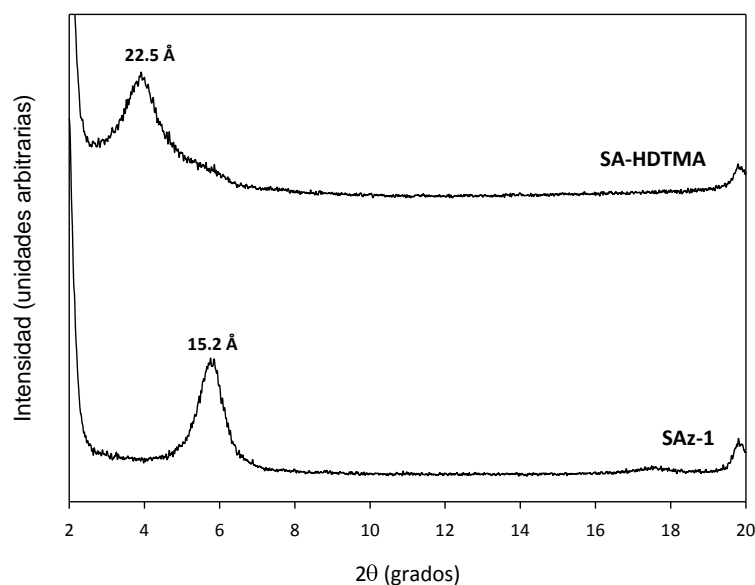


Figura 4.8. Difractogramas de rayos X de las muestras de SAz-1 y SA-HDTMA.

c) Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojos tanto de la arcilla sin modificar como de la arcilla modificada se han representado en la Figura 4.9.

- SAz-1: El espectro de IR presenta un par de bandas a 3610 y 3390 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión de los grupos hidroxilo, U_{OH} , bien de los grupos OH estructurales de la montmorillonita o de los enlaces OH de las moléculas de agua. También se observa una banda a 1630 cm^{-1} que se puede asignar a vibraciones de modo de flexión (δ_{OH}) de las moléculas de agua y una banda a 980 cm^{-1} atribuido a vibraciones de tensión de Si-O-Si en el mineral de arcilla.

- SA-HDTMA: La banda a 3610 cm^{-1} no varía tras la incorporación del catión orgánico, lo cual es indicativo de que la modificación de la interlámina no supuso cambios en la estructura de la arcilla. Sin embargo, las bandas correspondientes a las moléculas de agua (U_{OH} y δ_{OH}) aparecen ligeramente desplazadas a números de onda mayores debido a una mayor libertad de las moléculas de agua en la organo-arcilla que en la arcilla de partida. Esto se atribuye a que las interacciones entre las moléculas de agua con los cationes orgánicos son más débiles que las que se daban en

la arcilla SAz-1 entre dichas moléculas de agua y los cationes Ca^{2+} . Además, la baja intensidad observada en estas bandas es consecuencia del menor grado de hidratación que se da en la muestra SA-HDTMA comparado con SAz-1. En el espectro de SA-HDTMA aparece un conjunto de bandas, ausentes en el espectro de la arcilla, que corresponden a las vibraciones del catión orgánico: a 2923 y 2851 cm^{-1} vibraciones de tensión simétrica y asimétrica de C-H y una serie de bandas entre 1487 y 1416 cm^{-1} propias de vibraciones de flexión de los grupos C-H (Gámiz et al., 2015).

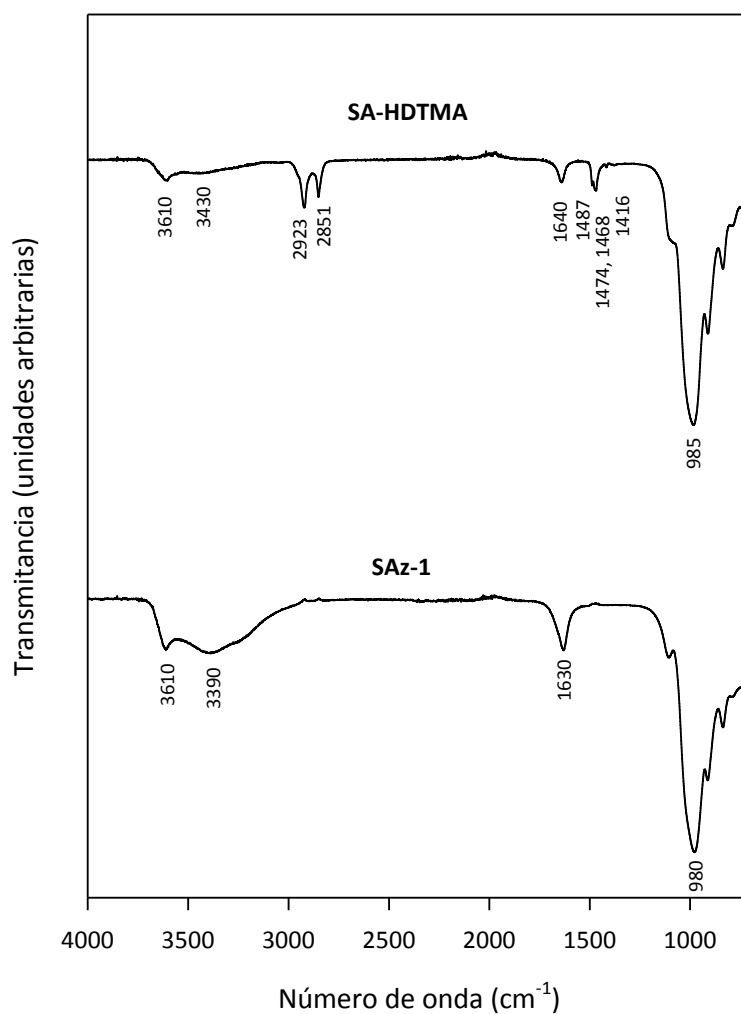


Figura 4.9. Espectros de infrarrojos de la muestra de montmorillonita SAz-1 sin modificar y modificada con HDTMA.

d) Modelización de la estructura de la organo-arcilla

La estructura esperada para la organo-arcilla es aquella en la que el catión orgánico HDTMA se dispone en una posición parafínica en el espacio interlaminar de la arcilla SAz-1 (Celis et al., 2000; Lagaly, 1982). La arcilla SAz-1 es de alta carga, de modo que la proximidad de dos cargas adyacentes promueve una disposición vertical de las cadenas alquílicas del catión orgánico. No obstante, una disposición perpendicular del catión respecto a la superficie supondría un espaciado basal de aproximadamente 35 Å, valor superior al observado en la difracción de rayos X de nuestra muestra (22.5 Å). Esto indica que el catión orgánico adopta cierto ángulo de inclinación en la interlámina. Así, considerando que el espaciado de la lámina deshidratada de montmorillonita es de 10 Å y que la cadena del catión orgánico presenta una longitud de 25 Å (Lee et al., 2005), la molécula de HDTMA debe disponerse en el espacio interlaminar con un ángulo de inclinación de unos 30° (Figura 4.10)

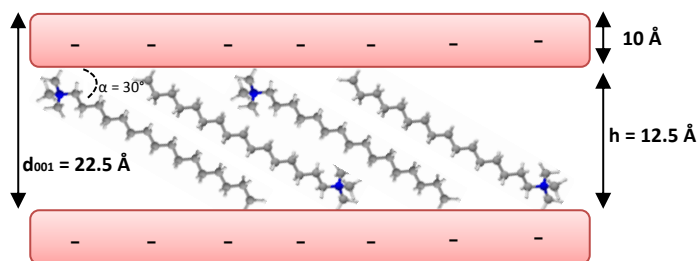


Figura 4.10. Posible estructura de la organo-arcilla SA-HDTMA en la que el catión orgánico adopta una disposición parafínica en la interlámina.

4.2. ESTUDIO ENANTIOSELECTIVO DEL COMPORTAMIENTO DEL FUNGICIDA METALAXIL

En este apartado, se discutirán los resultados obtenidos en los estudios del comportamiento enantioselectivo del fungicida metalaxil en suelos sin enmendar y enmendados con residuos orgánicos y con organo-hidrotalcitas. Para ello, se realizaron experimentos de adsorción, persistencia y lixiviación bajo condiciones controladas de laboratorio, así como de persistencia y lixiviación en condiciones reales de campo.

4.2.1. Estudios de adsorción-desorción en condiciones de laboratorio

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la adsorción de los enantiómeros del metalaxil en los adsorbentes (ALP, ALPc, HT-CO₃, HT₅₀₀, HT-ELA y SA-HDTMA) a una única concentración de metalaxil racémico (*rac*-metalaxil) de 2 mg/l (1 mg/l de cada enantiómero), para seleccionar aquellos adsorbentes con mayor capacidad de adsorción. A continuación, se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción en un rango de concentraciones 2-30 mg/l de *rac*-metalaxil para aquellas muestras con mejores propiedades adsorbentes. Finalmente, se determinaron las isothermas de adsorción-desorción a los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con los adsorbentes seleccionados.

4.2.1.1. Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes

a) Adsorción a concentración única

En la Figura 4.11 se observa que las muestras de ALP y ALPc presentaron una adsorción similar, con una leve mayor adsorción en el alperujo compostado (ALPc) que en el fresco (ALP). Por otro lado, la adsorción de los enantiómeros a las muestras de organo-arcilla fue considerablemente superior a la de las enmiendas orgánicas, siendo la adsorción en la muestra de HT-ELA prácticamente el doble que en la muestra de SA-HDTMA. Cabe destacar que la hidrotalcita de partida, HT-CO₃, no mostró adsorción de los enantiómeros del metalaxil, como tampoco lo hizo su producto de calcinación, HT₅₀₀, que, al proporcionar un ambiente muy alcalino (pH > 10), indujo la hidrólisis del fungicida.

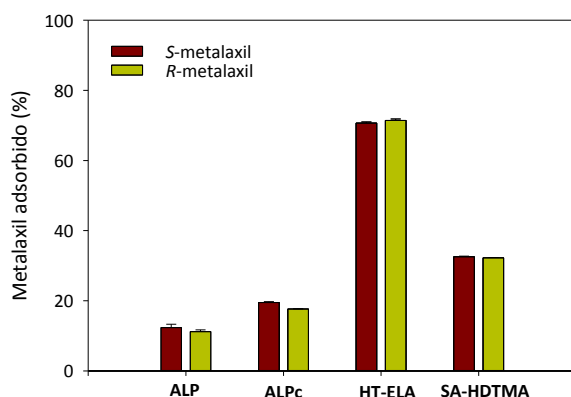


Figura 4.11. Porcentaje de S- y R-metalaxil adsorbido por los adsorbentes ALP, ALPc, HT-ELA y SA-HDTMA a una concentración inicial de 2 mg/l de *rac*-metalaxil.

Los valores de K_d y % de adsorción para cada enantiómero, así como para la mezcla racémica, se resumen en la Tabla 4.8. En esta tabla también se ha incluido el valor del factor enantiomérico (EF) calculado para cada muestra según la ecuación (Harner et al., 2000):

$$EF = \frac{C_e(S)}{C_e(S) + C_e(R)} \quad \text{Ec. 4.4}$$

donde $C_e(S)$ y $C_e(R)$ son las concentraciones de equilibrio de los enantiómeros S y R del metalaxil, respectivamente.

Los valores de EF obtenidos, cercanos a 0.5, indican que para los cuatro adsorbentes la disolución de equilibrio se mantuvo racémica tras la adsorción y que, por tanto, la adsorción del metalaxil no fue enantioselectiva (Tabla 4.8). Esta ausencia de enantioselectividad observada en los residuos de almazara y en las arcillas modificadas refleja que no existen sitios de adsorción enantioselectivos en los adsorbentes o que, si existen, están compensados para uno y otro enantiómero (Gámiz et al., 2016a). Los coeficientes de distribución, K_d , para la muestra de HT-ELA y SA-HDTMA fueron muy superiores a los calculados para el ALP y el ALPc. Esta mayor adsorción del fungicida en las organo-arcillas refleja la gran afinidad de las cadenas carbonadas de los aniones y cationes orgánicos de HT-ELA y SA-HDTMA, respectivamente, por los enantiómeros del fungicida, que probablemente se unen a ellas a través de interacciones hidrofóbicas no enantioselectivas. La mayor adsorción detectada en la muestra de HT-ELA al compararla con la muestra de SA-HDTMA

(Figura 4.11, Tabla 4.8), se atribuye al mayor espaciado interlamilar que presenta la hidrotalcita modificada (Figuras 4.7 y 4.10) y a su mayor contenido en C (39.1 % frente a 22.1% de la SA-HDTMA). Esto se traduce en un ambiente interlamilar de la muestra de HT-ELA con una mayor capacidad de adsorción que el de la muestra de SA-HDTMA.

Tabla 4.8. Valores de K_d para la adsorción del metalaxil en ALP, ALPc, HT-ELA y SA-HDTMA a partir de una disolución de *rac*-metalaxil de 2 mg/l.

		% Adsorbido	K_d (l/kg)	EF
ALP	<i>S</i> -metalaxil	12.3 ± 1.0	11.3 ± 1.0	0.50 ± 0.00
	<i>R</i> -metalaxil	11.2 ± 0.5	10.1 ± 0.5	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	11.8 ± 0.7	10.7 ± 0.7	
ALPc	<i>S</i> -metalaxil	19.5 ± 0.2	19.4 ± 0.2	0.50 ± 0.01
	<i>R</i> -metalaxil	17.6 ± 0.1	17.1 ± 0.1	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	18.6 ± 0.1	18.2 ± 0.1	
HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	70.6 ± 0.3	1927 ± 30	0.51 ± 0.01
	<i>R</i> -metalaxil	71.4 ± 0.4	2000 ± 42	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	71.0 ± 0.3	1963 ± 32	
SA-HDTMA	<i>S</i> -metalaxil	32.5 ± 0.1	386 ± 2	0.50 ± 0.00
	<i>R</i> -metalaxil	32.2 ± 0.1	380 ± 2	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	32.4 ± 0.0	383 ± 1	

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionaron como adsorbentes a estudiar los dos residuos de almazara (ALP y ALPc) y la hidrotalcita modificada con el anión elaidato (HT-ELA), ésta por mostrar un porcentaje de adsorción significativamente mayor al de la montmorillonita modificada con el catión HDTMA (SA-HDTMA).

b) Isotermas de adsorción-desorción

Las isotermas de adsorción-desorción de *S*- y *R*-metalaxil en los adsorbentes se presentan en la Figura 4.12. Lo primero que se observa es que las isotermas de los dos enantiómeros solapan, confirmando la ausencia de enantioselectividad observada en el estudio a una única concentración (Figura 4.11, Tabla 4.8).

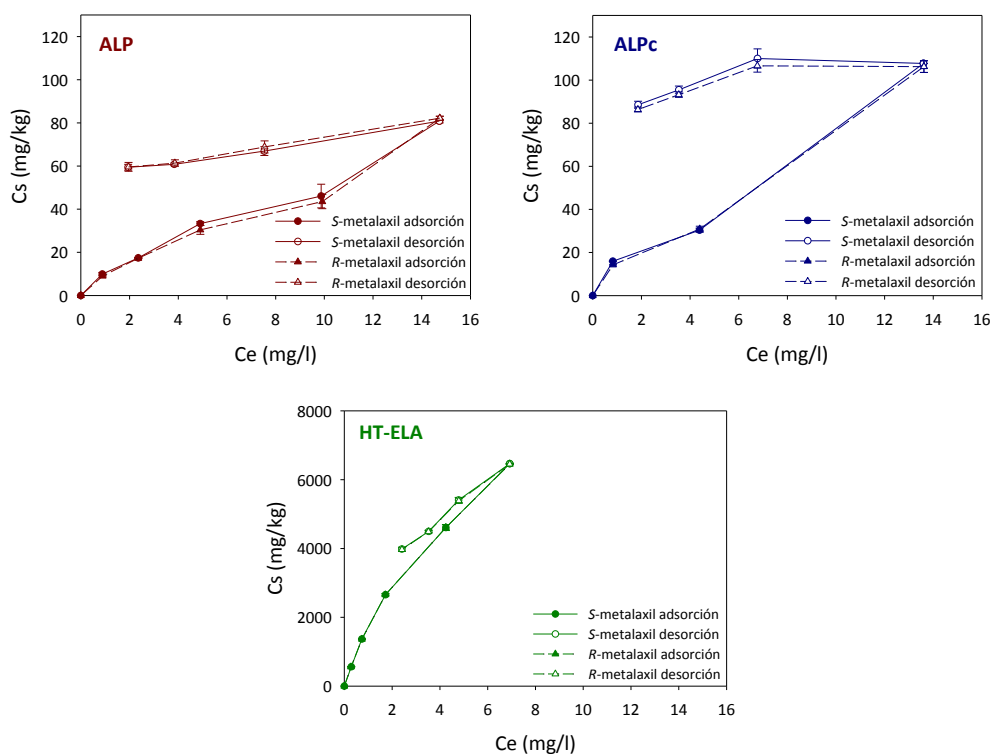


Figura 4.12. Isotermas de adsorción-desorción de los enantiómeros del metalaxil a los adsorbentes seleccionados a partir de disoluciones racémicas del fungicida.

Las isotermas se ajustaron a la ecuación de Freundlich (Ec. 1.3) y se determinaron los coeficientes empíricos de la ecuación, los cuales se resumen en la Tabla 4.9. Los valores de R^2 cercanos a 1 para los tres adsorbentes indican un buen ajuste de los datos experimentales a la ecuación. A partir del coeficiente N_f calculado es posible clasificar las isotermas según su pendiente inicial, de acuerdo con la clasificación de Giles et al. (1960). Así, aquellas isotermas que presentan un valor de $N_f < 1$, como es el caso de las isotermas de todos nuestros adsorbentes, se definen

como de tipo L. El mecanismo de adsorción de los sistemas que presentan este tipo de isothermas se caracteriza por ser la adsorción de las moléculas de plaguicida más difícil a medida que los sitios de adsorción son ocupados. Una posible explicación de este mecanismo es la existencia de un número limitado de sitios de adsorción y baja competencia con las moléculas del disolvente por dichos sitios (Giles et al., 1960).

Puesto que las isothermas de adsorción a los tres adsorbentes fueron del mismo tipo, es posible analizar el valor de K_f como indicativo de la afinidad de los adsorbentes por el fungicida. Los valores del coeficiente K_f para ALP y ALPc fueron similares, algo superiores en el caso del ALPc, siendo los valores para HT-ELA mucho más elevados. Esto refleja de nuevo una mayor capacidad de adsorción de la hidrotalcita modificada comparado con los residuos orgánicos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el análisis de la adsorción a una única concentración (Tabla 4.8). Es interesante destacar el hecho de que los valores de K_f para la mezcla racémica (*S+R*) del fungicida resultan ser superiores a los obtenidos para los enantiómeros individuales. Este resultado es consecuencia de haber medido las isothermas de adsorción de un enantiómero en presencia del otro, el cual, dada la forma L de las isothermas, reduce la adsorción del primero por competencia respecto a si no hubiera estado presente.

Tabla 4.9. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de metalaxil en ALP, ALPc y HT-ELA

		K_f	N_f	R^2
ALP	<i>S</i> -metalaxil	10 (9-11) ^a	0.71 ± 0.04	0.981
	<i>R</i> -metalaxil	9 (8-10)	0.74 ± 0.05	0.978
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	12 (10-14)	0.73 ± 0.06	0.981
ALPc	<i>S</i> -metalaxil	16 (11-22)	0.66 ± 0.20	0.914
	<i>R</i> -metalaxil	14 (11-20)	0.70 ± 0.17	0.943
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	21 (20-22)	0.70 ± 0.02	0.999
HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	1585 (1442-1742)	0.76 ± 0.04	0.991
	<i>R</i> -metalaxil	1597 (1524-1673)	0.75 ± 0.04	0.993
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	1885 (1768-2011)	0.75 ± 0.04	0.992

^arango de error estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos experimentales de las isothermas de desorción también se ajustaron a la ecuación de Freundlich (Ec. 1.3), presentándose los resultados en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Coeficientes de Freundlich para la desorción de los enantiómeros del metalaxil de ALP, ALPc y HT-ELA.

		K_{f-des}	N_{f-des}	R^2	TII
ALP	<i>S</i> -metalaxil	52 (47-56) ^a	0.15 ± 0.04	0.880	0.79
	<i>R</i> -metalaxil	55 (48-55)	0.16 ± 0.03	0.912	0.78
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	87 (80-95)	0.18 ± 0.03	0.931	0.76
ALPc	<i>S</i> -metalaxil	84 (79-89)	0.11 ± 0.04	0.830	0.83
	<i>R</i> -metalaxil	82 (77-86)	0.11 ± 0.03	0.880	0.84
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	156 (146-166)	0.10 ± 0.03	0.881	0.85
HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	2580 (2432-2738)	0.47 ± 0.04	0.985	0.38
	<i>R</i> -metalaxil	2570 (2431-2716)	0.47 ± 0.04	0.987	0.37
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	3746 (3436-4085)	0.47 ± 0.04	0.985	0.38

^arango de error estándar.

Para determinar el grado de reversibilidad del proceso de adsorción de los enantiómeros del metalaxil en los diferentes adsorbentes, se calculó el índice termodinámico de irreversibilidad (TII) a partir de la ecuación Ec. 1.5. TII puede tomar valores de 0 a 1 donde TII = 0 supone una adsorción completamente reversible y TII = 1 una adsorción irreversible. De este modo, se observó una baja reversibilidad del proceso de adsorción para el caso del ALP y ALPc, así como una mayor reversibilidad para la organo-hidrotalcita (Tabla 4.10).

4.2.1.2. Estudios de adsorción-desorción a suelos sin enmendar y enmendados

En la Figura 4.13 se representan las isotermas de adsorción para el *S*- y *R*-metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP (2%), ALPc (2%) y HT-ELA (0.5% y 1%). En el caso de los residuos de almazara, se seleccionó un porcentaje de enmienda del 2% por ser un valor realista teniendo en cuenta las dosis de aplicación del alperujo en el campo. Para la organo-hidrotalcita, debido a su elevada capacidad de adsorción, se decidió aplicarla en menor cantidad, en un porcentaje del 0.5 y 1%.

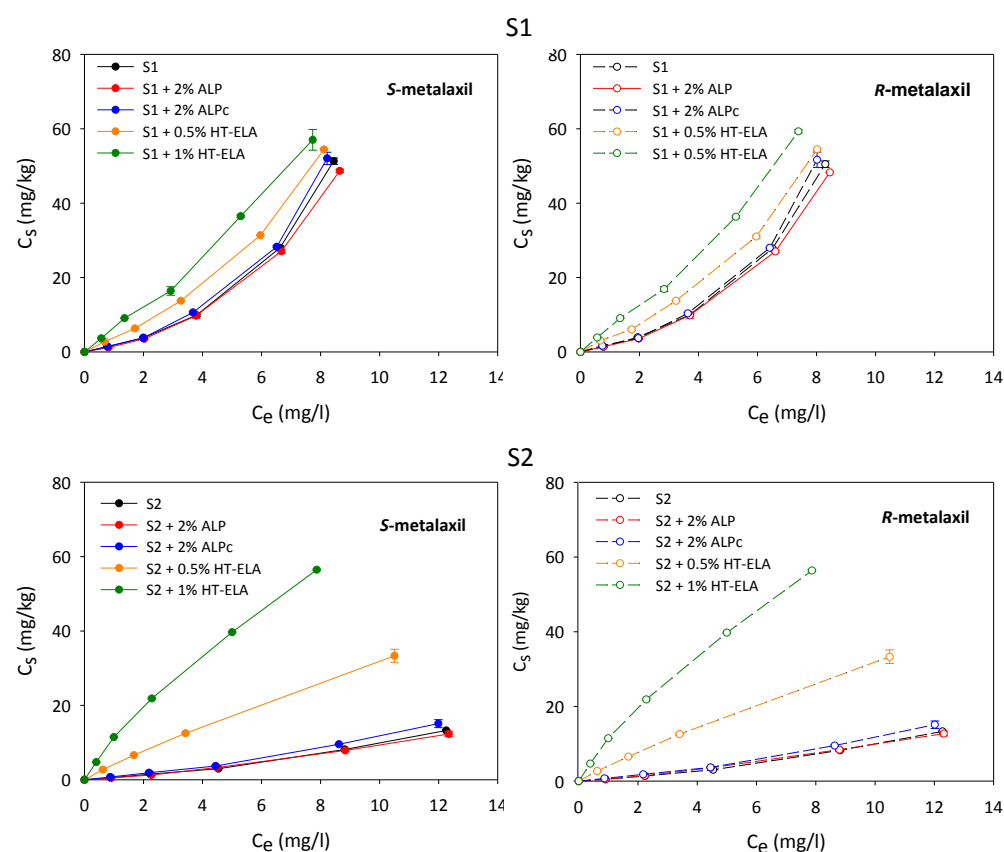


Figura 4.13. Isotermas de adsorción de *S*-metalaxil y *R*-metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP, ALPc y HT-ELA medidas a partir de disoluciones racémicas del fungicida.

De nuevo, no se observó enantioselectividad en la adsorción del metalaxil en los suelos sin enmendar ni enmendados con los residuos de almazara o la organo-

hidrotalcita. De este modo, se puede afirmar que ambos enantiómeros fueron adsorbidos por igual, bien por un predominio de sitios de adsorción no enantioselectivos, bien por la existencia de un número equivalente de sitios enantioselectivos para los dos enantiómeros (Gámiz et al., 2016a).

En realidad, uno de los pocos casos de adsorción enantioselectiva de un plaguicida quiral en partículas de suelo ha sido descrito por nuestro grupo de investigación en un trabajo muy reciente (Celis et al., 2015a). En este trabajo se observó cierta preferencia de adsorción del enantiómero *R* frente al *S* del fungicida metalaxil en un suelo franco arcillo arenoso, pero sólo cuando la adsorción fue medida a partir de disoluciones de metalaxil enriquecidas en el enantiómero *R*. Se observó que la enantioselectividad era mayor cuanto mayor era la concentración total del fungicida y cuanto mayor era la fracción de enantiómero *R* en las disoluciones enriquecidas. La explicación de este comportamiento es que la adsorción del metalaxil ocurre con interacciones intermoleculares entre las moléculas adsorbidas (adsorción cooperativa), las cuales son más estables cuando se establecen entre un mismo enantiómero (*R-R*) respecto a cuando se establecen entre distintos enantiómeros (*R-S*). Por ello, disoluciones enriquecidas en un enantiómero dan lugar a una adsorción mayor que disoluciones racémicas y, en las primeras, el enantiómero mayoritario se adsorbe en mayor proporción que el minoritario (Celis et al., 2015a, Gámiz et al., 2016b).

Las isothermas de adsorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich, obteniéndose los parámetros que se resumen en la Tabla 4.11 y 4.12. Los valores de R^2 , en todos los casos, fueron próximos a 1, lo cual nos indica que los datos experimentales se ajustaron bien a la ecuación. Los coeficientes N_f para ambos suelos sin enmendar y enmendados con ALP y ALPc fueron mayores que 1. Según la clasificación de Giles (1960), las isothermas que presentan un valor de $N_f > 1$ se denominan isothermas tipo S y son propias de sistemas en los que a medida que la concentración de soluto aumenta la adsorción está favorecida (adsorción cooperativa). Giles et al. (1960) propusieron que estas isothermas aparecen cuando se dan tres situaciones: i) la molécula de soluto es monofuncional, ii) hay una moderada atracción intermolecular entre las moléculas de soluto adsorbidas y iii) existe una fuerte competencia por los sitios de adsorción entre las moléculas de soluto y moléculas del disolvente u otras moléculas presentes que puedan ser adsorbidas. El

proceso de adsorción del metalaxil cumple con todos estos requisitos, ya que el metalaxil es una molécula polar que puede adsorberse en superficies polares a través de los átomos de N u O presentes en su estructura. Además, es posible cierta competencia con moléculas de agua por los sitios de adsorción y pueden darse interacciones atractivas entre los anillos hidrofóbicos de moléculas adyacentes en el estado adsorbido.

Por otro lado, las isotermas de adsorción en los suelos enmendados con HT-ELA reflejan una disminución del valor del coeficiente N_f , que llega a ser < 1 (tipo L) para el suelo S2 enmendado con HT-ELA. Este tipo de isotermas se caracterizan por ser más difícil la adsorción a medida que las moléculas de soluto van ocupando sitios de adsorción y son características de sistemas en los que el soluto tiene poca competencia con las moléculas de disolvente por dichos sitios (Giles et al., 1960). Esta descripción se ajusta al sistema formado por las moléculas neutras de metalaxil y la organo-hidrotalcita (Figura 4.12), entre las que predominan las interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, la adsorción en los suelos enmendados con HT-ELA parece estar gobernada por la elevada capacidad adsorbente de la enmienda añadida (HT-ELA).

Tabla 4.11. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de S-, R- y (S+R)-metalaxil en el suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		K_f	N_f	R^2
S1	S-metalaxil	1.69 (1.40-2.04) ^a	1.49 ± 0.13	0.977
	R-metalaxil	1.70 (1.45-2.00)	1.50 ± 0.11	0.983
	(S+R)-metalaxil	1.20 (0.94-1.54)	1.49 ± 0.12	0.980
S1 + 2% ALP	S-metalaxil	1.38 (1.20-1.59)	1.57 ± 0.10	0.900
	R-metalaxil	1.67 (1.39-2.00)	1.48 ± 0.13	0.978
	(S+R)-metalaxil	1.06 (0.84-1.34)	1.52 ± 0.11	0.984
S1 + 2% ALPc	S-metalaxil	1.72 (1.42-2.06)	1.51 ± 0.13	0.989
	R-metalaxil	1.96 (1.56-2.46)	1.44 ± 0.16	0.963
	(S+R)-metalaxil	1.22 (0.93-1.60)	1.51 ± 0.13	0.977
S1 + 0.5% HT-ELA	S-metalaxil	3.80 (3.40-4.25)	1.20 ± 0.08	0.986
	R-metalaxil	3.97 (3.43-4.60)	1.17 ± 0.11	0.975
	(S+R)-metalaxil	3.43 (2.85-4.12)	1.18 ± 0.09	0.913
S1 + 1% HT-ELA	S-metalaxil	6.35 (5.94-6.79)	1.04 ± 0.05	0.993
	R-metalaxil	6.60 (6.16-7.06)	1.04 ± 0.05	0.998
	(S+R)-metalaxil	6.30 (5.72-6.92)	1.04 ± 0.05	0.993

^arango de error estándar

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.12. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-metalaxil en el suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		K_f	N_f	R^2
S2	<i>S</i> -metalaxil	0.56 (0.51-0.62) ^a	1.22 ± 0.06	0.993
	<i>R</i> -metalaxil	0.51 (0.47-0.55)	1.27 ± 0.05	0.996
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	0.45 (0.40-0.51)	1.25 ± 0.05	0.997
S2 + 2% ALP	<i>S</i> -metalaxil	0.51 (0.48-0.55)	1.25 ± 0.04	0.997
	<i>R</i> -metalaxil	0.52 (0.51-0.53)	1.28 ± 0.01	0.999
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	0.43 (0.45-0.41)	1.26 ± 0.02	0.999
S2 + 2% ALPc	<i>S</i> -metalaxil	0.79 (0.72-0.87)	1.15 ± 0.06	0.992
	<i>R</i> -metalaxil	0.77 (0.70-0.85)	1.16 ± 0.06	0.992
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	0.52 (0.47-0.57)	1.26 ± 0.04	0.996
S2 + 0.5% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	4.17 (3.97-4.38)	0.88 ± 0.00	0.999
	<i>R</i> -metalaxil	4.12 (3.65-4.64)	0.89 ± 0.01	1.000
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	4.47 (4.52-4.42)	0.89 ± 0.01	1.000
S2 + 1% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	10.74 (10.41-11.09)	0.82 ± 0.02	0.997
	<i>R</i> -metalaxil	10.74 (10.40-11.09)	0.82 ± 0.02	0.997
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	12.17 (11.67-12.72)	0.82 ± 0.02	0.996

^arango de error estándar

A partir de los valores de K_f obtenidos, fue posible evaluar el grado de adsorción del metalaxil en ambos suelos con los diferentes tratamientos. Se observó que los valores de K_f fueron mayores en el suelo S1 que en el suelo S2 (Tabla 4.11 y 4.12). Esta mayor adsorción en el suelo S1 fue consecuencia de su alto contenido en arcillas, especialmente en esmectitas (Tabla 4.2), ya que en suelos con bajos contenidos en carbono orgánico, como es el caso de los utilizados en este trabajo, la adsorción del metalaxil tiene lugar principalmente por la fracción arcilla de dichos suelos. Esto se debe a que el fungicida, con carácter polar, tiene una gran afinidad por las superficies internas de los minerales de la arcilla del grupo de las esmectitas (Fernandes et al., 2003; Celis et al., 2013).

Estudios previos han puesto de manifiesto que la adición de residuos orgánicos a suelos puede suponer una reducción de la adsorción del metalaxil debido a la competencia por los sitios de adsorción en el suelo entre el fungicida y la materia orgánica proporcionada por la enmienda (Fernandes et al., 2006). No obstante, en nuestro trabajo no se observaron cambios sustanciales en la adsorción del metalaxil al adicionar ALP o ALPc a ambos suelos. Gámiz et al. (2013, 2016a) observaron un comportamiento parecido en un suelo franco arenoso enmendado con residuos de

almazara similares a los utilizados en nuestro trabajo. Se sugirió que la reducción de los sitios de adsorción disponibles para el metalaxil por competencia con la materia orgánica estaba compensada por los nuevos sitios de adsorción suministrados por dicha materia orgánica. Cabe destacar una leve mayor adsorción de los enantiómeros de metalaxil en el suelo S2 enmendado con ALPc, lo que está de acuerdo con que este residuo mostrara una adsorción de metalaxil ligeramente mayor a la de ALP en el estudio con los adsorbentes individuales (Tabla 4.9).

En el caso de los suelos sin enmendar y enmendados con ALP y ALPc los valores de K_f para la mezcla racémica (S+R) del fungicida fueron inferiores a los obtenidos para los enantiómeros individuales. Este resultado es consecuencia de la forma S de las isothermas, ya que al medir la isoterma de adsorción de un enantiómero en presencia del otro, se incrementa la adsorción a una concentración de equilibrio determinada por un mecanismo de adsorción cooperativa respecto a si el otro enantiómero no hubiera estado presente.

Por su parte, el tratamiento de los suelos con HT-ELA supuso un gran aumento en la adsorción del metalaxil en los dos suelos (Tabla 4.11 y 4.12). Esta gran adsorción se atribuyó a la alta afinidad de la organo-hidrotalcita por los dos enantiómeros del fungicida (Figura 4.11, Tabla 4.8). El efecto de la adición de HT-ELA fue más evidente en el suelo S2 que en el suelo S1 debido, en parte, a la baja capacidad de adsorción que presentó el suelo S2 original comparada con el suelo S1. También es posible que la interacción con algunos componentes del suelo hayan reducido la capacidad adsorbente de la organo-hidrotalcita, por ejemplo por fenómenos de bloqueo de parte de su superficie, y que este efecto haya sido más acusado en el suelo S1, reduciendo la capacidad de adsorción de la mezcla (Gámiz et al., 2010).

Las isothermas de adsorción-desorción para los suelos sin enmendar y enmendados con los diferentes adsorbentes se muestran en las Figuras 4.14 y 4.15.

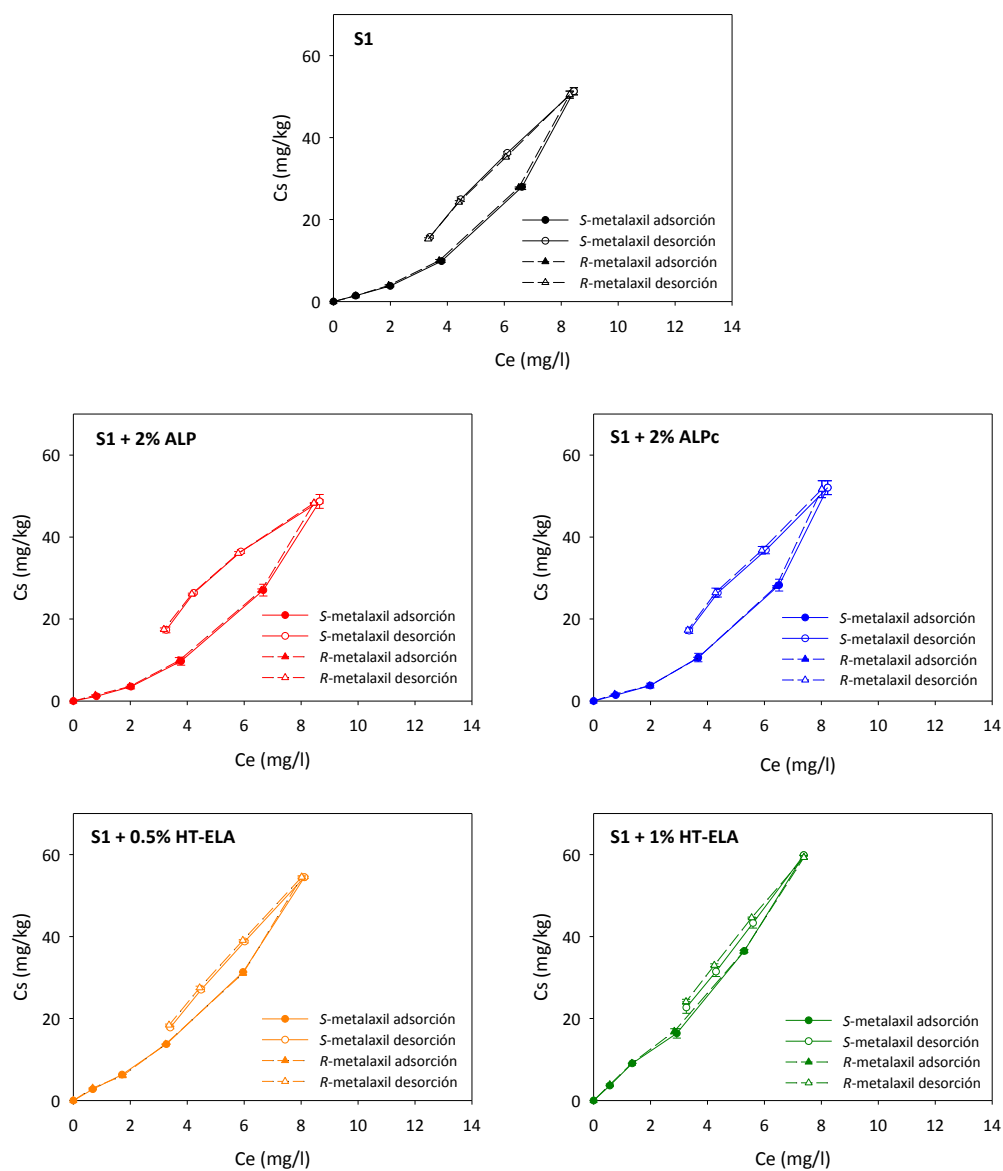


Figura 4.14. Isothermas de adsorción-desorción de S- y R-metalaxil al suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

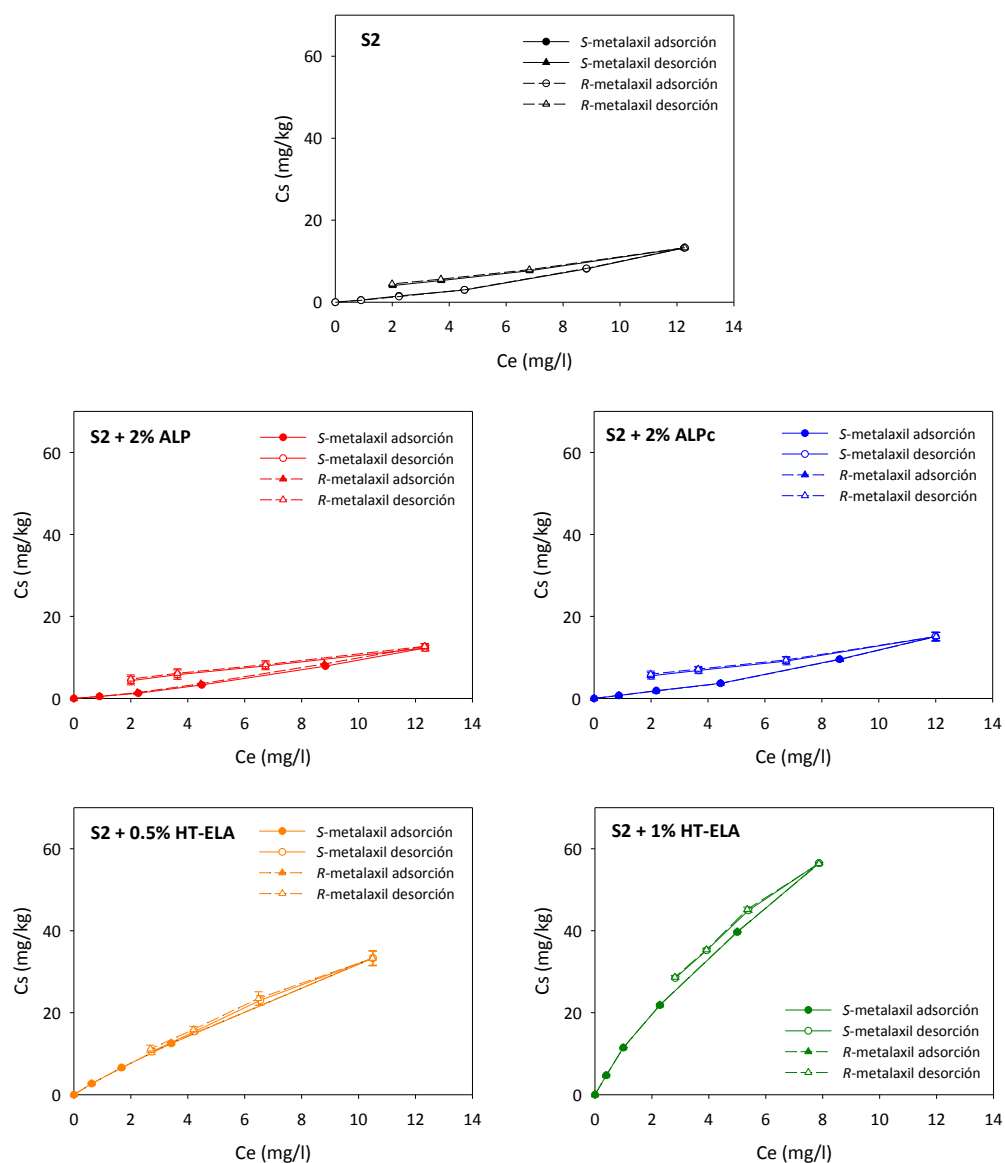


Figura 4.15. Isothermas de adsorción-desorción de S- y R-metalaxil al suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

Los datos experimentales de la desorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich y los coeficientes obtenidos se presentan en la Tabla 4.13 y 4.14. El proceso de desorción del metalaxil en el suelo S1 ($TII = 0.14$) resultó más reversible

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que en el suelo S2 ($TII \approx 0.5$). La adición de los residuos orgánicos a ambos suelos no alteró significativamente la desorción del metalaxil obteniéndose un valor de TII similar en todos los tratamientos. Por el contrario, la desorción del metalaxil en los suelos enmendados con HT-ELA presentó una alta reversibilidad, lo cual se confirmó con los valores de TII cercanos a 0 para ambos suelos.

La diferente reversibilidad de la adsorción que mostraron los suelos tratados con los adsorbentes indica la posibilidad de distintos usos para cada uno. Así, la baja-media reversibilidad de la adsorción del metalaxil en los suelos enmendados con ALP y ALPc haría factible el uso de estos adsorbentes para inmovilizar el fungicida en el suelo, mientras que la alta reversibilidad de la adsorción del metalaxil en ambos suelos tratados con HT-ELA, supone que la organo-hidrotalcita puede ser usada como adsorbente que libere el fungicida lentamente manteniendo una elevada biodisponibilidad de éste en los suelos.

Tabla 4.13. Coeficientes de Freundlich para la desorción de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-metalaxil en el suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		K_{f-des}	N_{f-des}	R^2	TII
S1	S-metalaxil	3.48 (2.98-4.08) ^a	1.28 ± 0.09	0.990	0.14
	R-metalaxil	3.38 (2.95-3.88)	1.29 ± 0.08	0.992	0.14
	(S+R)-metalaxil	2.82 (2.30-3.46)	1.28 ± 0.09	0.991	0.14
S1 + 2% ALP	S-metalaxil	5.51 (4.45-6.81)	1.03 ± 0.13	0.957	0.34
	R-metalaxil	5.71 (4.78-6.83)	1.02 ± 0.11	0.978	0.31
	(S+R)-metalaxil	5.35 (4.07-7.04)	1.04 ± 0.12	0.975	0.32
S1 + 2% ALPc	S-metalaxil	4.16 (3.58-4.84)	1.21 ± 0.09	0.989	0.20
	R-metalaxil	4.28 (3.69-4.97)	1.21 ± 0.09	0.989	0.16
	(S+R)-metalaxil	3.53 (2.86-4.36)	1.22 ± 0.09	0.989	0.19
S1 + 0.5% HT-ELA	S-metalaxil	3.82 (3.46-4.24)	1.28 ± 0.04	0.996	0.00
	R-metalaxil	4.20 (3.85-4.59)	1.24 ± 0.05	0.996	0.00
	(S+R)-metalaxil	3.34 (2.92-3.81)	1.26 ± 0.06	0.996	0.00
S1 + 1% HT-ELA	S-metalaxil	6.51 (5.87-7.21)	1.08 ± 0.06	0.993	0.00
	R-metalaxil	6.72 (6.40-7.05)	1.10 ± 0.03	0.995	0.00
	(S+R)-metalaxil	6.24 (5.61-6.94)	1.08 ± 0.05	0.996	0.00

^arango de error estándar

Tabla 4.14. Coeficientes de Freundlich para la desorción de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-metalaxil en el suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		K_{f-des}	N_{f-des}	R^2	TII
S2	<i>S</i> -metalaxil	2.40 (2.09-2.76) ^a	0.65 ± 0.08	0.970	0.47
	<i>R</i> -metalaxil	2.75 (2.38-3.16)	0.60 ± 0.06	0.960	0.52
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	3.34 (2.76-4.06)	0.62 ± 0.08	0.960	0.50
S2 + 2% ALP	<i>S</i> -metalaxil	2.84 (2.65-3.05)	0.57 ± 0.04	0.990	0.55
	<i>R</i> -metalaxil	3.14 (2.90-3.41)	0.54 ± 0.05	0.980	0.58
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	3.98 (3.58-4.43)	0.56 ± 0.04	0.987	0.56
S2 + 2% ALPc	<i>S</i> -metalaxil	3.52 (3.04-4.07)	0.55 ± 0.08	0.950	0.63
	<i>R</i> -metalaxil	3.88 (3.37-4.46)	0.51 ± 0.08	0.950	0.56
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	4.99 (4.08-6.10)	0.54 ± 0.08	0.954	0.57
S2 + 0.5% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	4.44 (4.29-4.60)	0.86 ± 0.02	0.999	0.02
	<i>R</i> -metalaxil	5.02 (4.83-5.22)	0.81 ± 0.02	0.998	0.09
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	5.29 (5.03-5.57)	0.84 ± 0.02	0.999	0.06
S2 + 1% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	14.1 (13.6-14.6)	0.68 ± 0.02	0.998	0.17
	<i>R</i> -metalaxil	14.4 (13.8-15.1)	0.67 ± 0.03	0.996	0.19
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	17.9 (16.9-18.9)	0.67 ± 0.02	0.997	0.18

^arango de error estándar

4.2.2. Estudios de persistencia en condiciones de laboratorio

Se realizó un estudio de la persistencia de los enantiómeros del metalaxil aplicado como mezcla racémica a los suelos S1 y S2 a una dosis de 2 mg/kg y se evaluó el efecto de la adición de los diferentes adsorbentes en dicha persistencia. Adicionalmente, en el suelo S2 se analizaron los posibles cambios en la disipación de los enantiómeros producidos por una segunda aplicación del fungicida, así como por un aumento de la dosis de aplicación del mismo (20 mg/kg).

La principal causa de la degradación del metalaxil en los suelos es microbiológica (Buser et al., 2002). Estudios recientes han demostrado que la acción de enzimas extracelulares del suelo contribuye de forma importante a la degradación del fungicida (Botterweck et al., 2014; Kalathoor et al., 2015). De este modo, a pesar de ser estable químicamente en un amplio rango de pH (pH < 9), este fungicida se degrada enantioselectivamente en suelos, animales y plantas por la rotura del grupo

éster y posteriormente, por una serie de biotransformaciones oxidativas (N-desalquilaciones, alquilaciones e hidroxilaciones aromáticas). Como principal metabolito del metalaxil en suelos se ha identificado el metalaxil ácido (ácido 2-[2,6-dimetilfenil]metoxiacetilamino]-propanoico) (Sukul & Spiteller, 2001), el cual retiene la configuración del enantiómero del que procede (Figura 4.16). A partir de éste, se formarán otros metabolitos a través de diferentes rutas metabólicas, siendo estas transformaciones también enantioselectivas con retención de la configuración (Buser et al., 2002). Kalathoor et al. (2005) señalaron que los residuos no extractables en suelos, es decir, fuertemente retenidos y escasamente bioaccesibles o biodisponibles, están dominados por el metabolito ácido del metalaxil frente al compuesto original.

Para el estudio de la persistencia del metalaxil se tuvo en cuenta que la inversión quiral no es un proceso relevante en el caso de los enantiómeros del metalaxil, debido a que la enantiomerización del plaguicida es insignificante al compararla con la degradación (Buser et al., 2002).

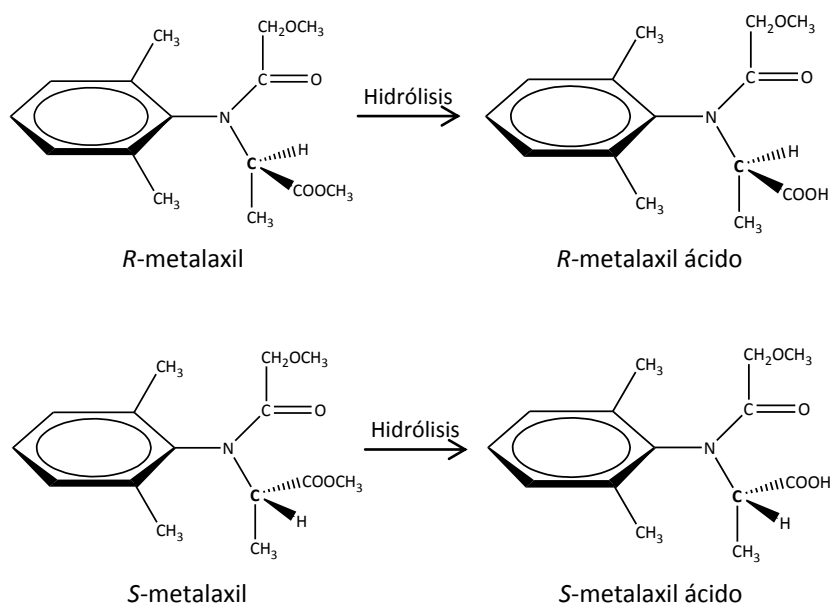


Figura 4.16. Estructura química de los enantiómeros del metalaxil y de sus correspondientes metabolitos.

4.2.2.1. Persistencia en los suelos sin enmendar

Las curvas de disipación para el *S*- y el *R*-metalaxil en los suelos S1 y S2 se han representado en la Figura 4.17 junto con la variación de la fracción enantiomérica (EF) con el tiempo de incubación.

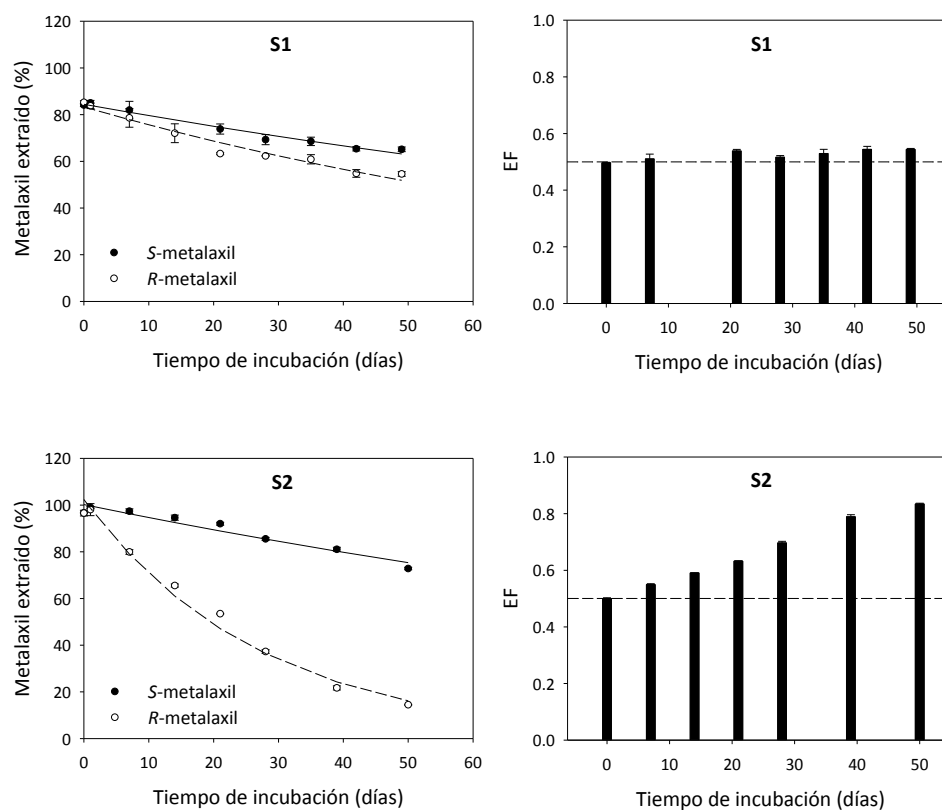


Figura 4.17. Curvas de disipación de los enantiómeros *S*- y *R*-metalaxil y cambios en EF durante el periodo de incubación de *rac*-metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

La degradación del metalaxil en ambos suelos fue enantioselectiva, con una degradación más rápida del enantiómero *R* frente al *S*. Buerge et al. (2003) sugirieron que existía una dependencia de la enantioselectividad de la degradación del metalaxil con el pH. Así, en condiciones aeróbicas, el *R*-metalaxil se degrada a mayor velocidad que el *S*-metalaxil en suelos con pH > 5, mientras que en suelos con pH < 4 el enantiómero *S* es el que se degrada preferentemente. La justificación de este comportamiento es que la biodegradación del fungicida es consecuencia de

reacciones enzimáticas de los microorganismos o de enzimas extracelulares y dichas reacciones suelen verse afectadas por el pH. Los suelos utilizados en nuestro estudio son alcalinos, por lo que la degradación más rápida del enantiómero *R* observada en los mismos concuerda con los resultados de Buerge et al. (2003).

Los datos experimentales se ajustaron a una cinética de primer orden obteniéndose los parámetros que se resumen en la Tabla 4.15 y 4.16. Para evaluar la enantioselectividad de la degradación del metalaxil en el suelo al aplicar los diferentes tratamientos, se han incluido en esta tabla los factores de enantioselectividad (ES) calculados según la expresión (Müller & Buser, 1995):

$$ES = \frac{(k_1 - k_2)}{(k_1 + k_2)} \quad \text{Ec. 4.5}$$

donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad del enantiómero que se degrada más rápidamente (en nuestro caso el *R*-metalaxil) y del enantiómero que se degrada más lentamente (en nuestro caso el *S*-metalaxil), respectivamente. ES puede tomar valores en el rango de 0 (proceso no enantioselectivo: $k_1 = k_2$) a 1 (proceso completamente enantioselectivo $k_2 = 0$ o $k_2 \ll k_1$)

A partir de estos parámetros se concluyó que la degradación del *R*-metalaxil fue más rápida en el suelo S2 ($t_{1/2} = 18$ días) que en el suelo S1 ($t_{1/2} = 71$ días). La degradación más lenta en el suelo S1 se atribuyó a la mayor adsorción del fungicida en este suelo (Tabla 4.11 y 4.12), la cual lo protegió de ser biodegradado. En el caso del enantiómero *S*, la velocidad de degradación fue similar en ambos suelos, probablemente debido a que la velocidad de degradación de este enantiómero fue tan lenta que no se vio afectada por la mayor adsorción en el suelo S1. Otra característica de los suelos que puede afectar a la disipación del metalaxil es la porosidad de los mismos. A partir de la porosimetría de intrusión de mercurio (Figura 4.1) se obtuvo que en el suelo S1 el 34% de la porosidad total corresponde a poros de radio $< 0.1 \mu\text{m}$, mientras que en el caso del suelo S2, sólo el 6% corresponde a poros de este tamaño. La entrada del plaguicida en los poros pequeños hace que tengan más difícil acceso los microorganismos que lo degradan. De este modo, tanto la mayor adsorción del metalaxil en la fracción arcilla esmectita+ilita como la abundancia de poros de pequeño tamaño en el suelo arcilloso (S1) pudieron hacer que el fungicida

estuviera menos disponible para ser degradado por los microorganismos y, por tanto, fuera más persistente.

A partir de los datos de la Tabla 4.15 y 4.16 se concluye que al considerar los valores de tiempo de vida media que se obtienen al analizar el metalaxil como un compuesto aquiral (*S+R*) se sobreestima la persistencia del enantiómero activo (*R*-metalaxil) y se subestima la persistencia del enantiómero inactivo (*S*-metalaxil). Esto conlleva a errores en la predicción de la eficacia biológica esperada para el compuesto, ya que ésta recae casi exclusivamente en el enantiómero *R* (Buerge et al., 2003; Chen & Liu, 2009).

Tabla 4.15. Constantes del ajuste de los datos de disipación de metalaxil a una cinética de primer orden en suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	R^2	ES
S1	<i>S</i> -metalaxil	0.0059 ± 0.0004^a	117	0.974	0.24
	<i>R</i> -metalaxil	0.0097 ± 0.0007	71	0.961	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.0077 ± 0.0005	90	0.976	
S1 + 2% ALP	<i>S</i> -metalaxil	0.0193 ± 0.0019	36	0.945	0.19
	<i>R</i> -metalaxil	0.0282 ± 0.0013	25	0.988	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.0231 ± 0.011	30	0.987	
S1 + 2% ALPc	<i>S</i> -metalaxil	0.0083 ± 0.0014	84	0.834	0.21
	<i>R</i> -metalaxil	0.0127 ± 0.0012	55	0.944	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.0104 ± 0.0014	67	0.893	
S1 + 0.5% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	0.0079 ± 0.0005	88	0.982	0.31
	<i>R</i> -metalaxil	0.0151 ± 0.0013	46	0.949	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.0111 ± 0.0015	62	0.882	
S1 + 1% HT-ELA	<i>S</i> -metalaxil	0.0010 ± 0.0006	693	0.295	0.66
	<i>R</i> -metalaxil	0.0049 ± 0.0007	141	0.875	
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.0027 ± 0.0006	257	0.776	

^a valor \pm error estándar

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.16. Constantes del ajuste de los datos de disipación de metalaxil a una cinética de primer orden en suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc y HT-ELA.

		k (días ⁻¹)	t _{1/2} (días)	R ²	ES
S2	S-metalaxil	0.0057 ± 0.0006 ^a	122	0.946	0.73
	R-metalaxil	0.0369 ± 0.0019	18	0.988	
	(S+R)-metalaxil	0.0164 ± 0.0005	42	0.995	
S2 + 2% ALP	S-metalaxil	0.0107 ± 0.0018	65	0.864	0.27
	R-metalaxil	0.0185 ± 0.0017	38	0.961	
	(S+R)-metalaxil	0.0142 ± 0.0017	49	0.935	
S2 + 2% ALPc	S-metalaxil	0.0048 ± 0.0005	144	0.936	0.62
	R-metalaxil	0.0206 ± 0.0020	34	0.957	
	(S+R)-metalaxil	0.0144 ± 0.0009	48	0.969	
S2 + 0.5% HT-ELA	S-metalaxil	0.0059 ± 0.0009	118	0.889	0.62
	R-metalaxil	0.0254 ± 0.0018	27	0.976	
	(S+R)-metalaxil	0.0136 ± 0.0009	51	0.975	
S2 + 1% HT-ELA	S-metalaxil	0.0019 ± 0.0006	365	0.610	0.74
	R-metalaxil	0.0128 ± 0.0016	54	0.920	
	(S+R)-metalaxil	0.0067 ± 0.0009	103	0.923	

^a valor ± error estándar

Los valores de EF indican una mayor enantioselectividad del proceso de degradación en el suelo S2 (Figura 4.17). Al final del experimento de incubación, los residuos de metalaxil en el suelo S2 presentaron un valor de EF= 0.83, lo que supone que el 83% del metalaxil residual obtenido estaba en forma de S-metalaxil y sólo el 17% era R. Por el contrario, en el suelo S1 se obtuvo un valor de EF al final de la incubación de 0.54, lo cual indicó que la degradación del metalaxil en este suelo no fue muy enantioselectiva. Los valores de ES calculados para los suelos confirmaron la alta enantioselectividad de la disipación en el suelo S2 (ES= 0.73) y la baja enantioselectividad en el caso del suelo S1 (ES= 0.24).

La Tabla 4.17 se configuró a partir de los resultados obtenidos del análisis de las alícuotas de disolución de suelo extraídas con tubos Pall a tres tiempos de incubación ($t_0=0$, $t_1=28$ y $t_2=49$ días para el suelo S1 y $t_0=0$, $t_1=21$ y $t_2=50$ días para el suelo S2). A partir de la concentración medida en dicha alícuota de disolución de suelo y de la cantidad total de fungicida obtenida de la extracción con metanol, para cada tiempo se determinó el valor de la constante de distribución (K_d) para cada enantiómero, así como la fracción enantiomérica en disolución. Se observa que los valores de K_d para el suelo S1 a tiempo 0 fueron iguales para ambos enantiómeros y que a medida que aumentó el tiempo de incubación dichos valores fueron aumentando. Este aumento en el valor de K_d puede atribuirse a un aumento de la adsorción con el tiempo como resultado de procesos de adsorción lenta (Cox et al., 1998; Celis & Koskinen, 1999; Cox & Walker, 1999). Sin embargo, los datos de la Tabla 4.17 reflejan que el aumento en el valor de K_d es más pronunciado para el enantiómero *R* que para el *S*. Esto podría estar relacionado con la biodegradación preferencial del enantiómero *R*, que a medida que lo hace desaparecer de la disolución provoca una acumulación del mismo en la fase adsorbida, aumentando el valor de K_d (Cox & Walker, 1999). Este mismo comportamiento se observó con el suelo S2, para el que las diferencias entre los valores de K_d de los dos enantiómeros fueron incluso más acusadas debido a la mayor diferencia en la degradación de los dos enantiómeros que tuvo lugar en este suelo. En el caso del suelo S2, los valores de K_d fueron considerablemente menores a los del suelo S1, reflejando la mayor adsorción del metalaxil en el suelo arcilloso que en el suelo franco-arenoso, como ya pusieron de manifiesto las isotermas de adsorción (Tabla 4.11 y 4.12). En el suelo S1, el valor de EF de los residuos de metalaxil en disolución aumentó ligeramente hasta un valor de 0.54 al final del experimento, mientras que en el suelo S2 lo hizo hasta un valor de 0.82, reflejando la rápida degradación del enantiómero *R* frente al *S* que tiene lugar en este último suelo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.17. Constantes de distribución de los enantiómeros del metalaxil y valores de EF de los residuos en disolución medidos durante las incubaciones en suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP, ALPc y HT-ELA.

		t_0		t_1		t_2	
		K_d	EF	K_d	EF	K_d	EF
S1	S-	1.20 ± 0.01^a		1.37 ± 0.03		1.48 ± 0.08	
	R-	1.21 ± 0.01	0.50	1.54 ± 0.01	0.51	1.80 ± 0.07	0.53
	(S+R)-	1.21 ± 0.01		1.45 ± 0.02		1.61 ± 0.08	
S1 + 2% ALP	S-	1.29 ± 0.02		2.33 ± 0.03		2.13 ± 0.11	
	R-	1.28 ± 0.02	0.50	1.72 ± 0.01	0.59	1.90 ± 0.09	0.64
	(S+R)-	1.28 ± 0.02		1.99 ± 0.02		2.04 ± 0.10	
S1 + 2% ALPc	S-	1.59 ± 0.02		1.51 ± 0.02		1.53 ± 0.08	
	R-	1.54 ± 0.04	0.50	1.52 ± 0.02	0.53	1.66 ± 0.07	0.56
	(S+R)-	1.57 ± 0.04		1.52 ± 0.02		1.60 ± 0.07	
S1 + 0.5% HT-ELA	S-	3.24 ± 0.01		2.03 ± 0.03		1.27 ± 0.07	
	R-	3.26 ± 0.05	0.50	1.68 ± 0.00	0.56	1.35 ± 0.05	0.59
	(S+R)-	3.25 ± 0.02		1.86 ± 0.02		1.26 ± 0.06	
S1 + 1% HT-ELA	S-	5.66 ± 0.11		-		-	
	R-	5.41 ± 0.01	0.50	-	-	-	-
	(S+R)-	5.54 ± 0.07		-		-	
S2	S-	0.48 ± 0.01		0.55 ± 0.04		0.55 ± 0.01	
	R-	0.47 ± 0.00	0.50	0.62 ± 0.03	0.62	0.84 ± 0.01	0.82
	(S+R)-	0.47 ± 0.00		0.58 ± 0.04		0.59 ± 0.01	
S2 + 2% ALP	S-	0.55 ± 0.00		0.72 ± 0.00		0.68 ± 0.02	
	R-	0.55 ± 0.00	0.50	0.56 ± 0.00	0.58	0.59 ± 0.02	0.61
	(S+R)-	0.55 ± 0.00		0.64 ± 0.00		0.64 ± 0.02	
S2 + 2% ALPc	S-	0.54 ± 0.02		0.62 ± 0.02		0.59 ± 0.01	
	R-	0.53 ± 0.02	0.50	0.58 ± 0.01	0.57	0.61 ± 0.02	0.71
	(S+R)-	0.53 ± 0.02		0.60 ± 0.01		0.60 ± 0.01	
S2 + 0.5% HT-ELA	S-	4.49 ± 0.22		0.84 ± 0.06		0.52 ± 0.00	
	R-	4.52 ± 0.21	0.50	0.91 ± 0.05	0.58	0.62 ± 0.02	0.72
	(S+R)-	4.50 ± 0.21		0.87 ± 0.05		0.55 ± 0.01	
S2 + 1% HT-ELA	S-	8.72 ± 0.00		-		-	
	R-	9.40 ± 0.00	0.50	-	-	-	-
	(S+R)-	90.4 ± 0.00		-		-	

^avalor \pm error estándar

4.2.2.2. Persistencia en los suelos enmendados con los residuos de almazara

En la Figura 4.18 se han representado las curvas de disipación de los enantiómeros *S* y *R* del metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP y ALPc, así como la variación del parámetro EF con el tiempo de incubación.

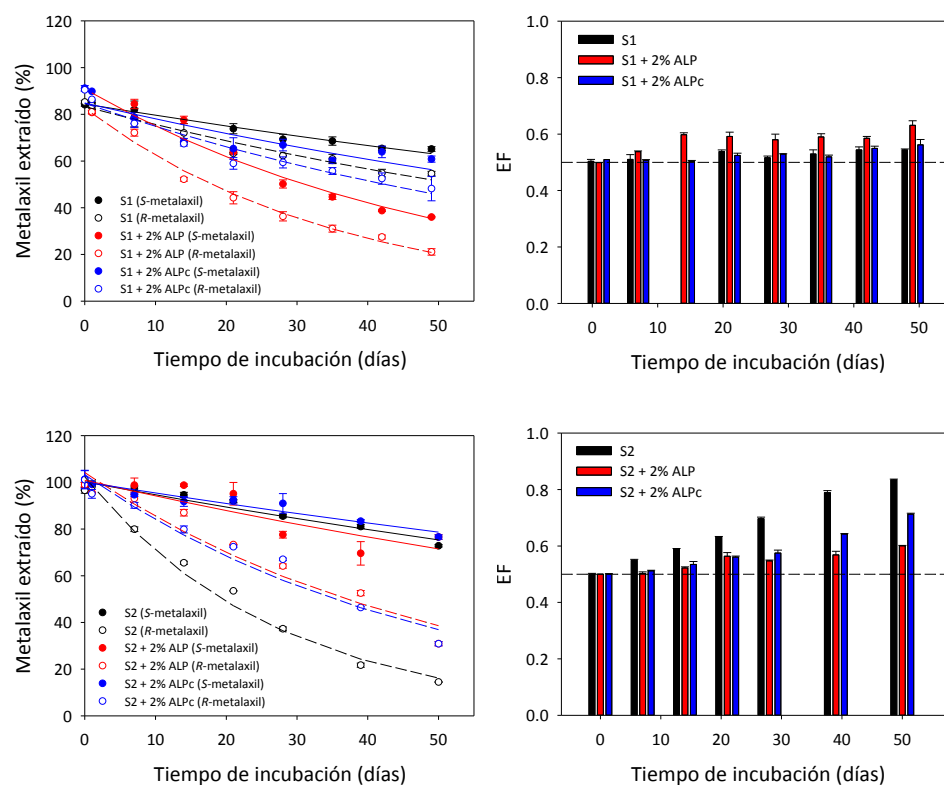


Figura 4.18. Curvas de disipación de los enantiómeros *S*- y *R*-metalaxil y cambios en EF durante el periodo de incubación de *rac*-metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados al 2% con ALP y ALPc. En las curvas de disipación, los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

El efecto de la adición de las enmiendas orgánicas fue diferente en función del suelo y del tipo de enmienda. Para el suelo S1, la adición de ALP y ALPc supuso un aumento en la velocidad de degradación de ambos enantiómeros. El $t_{1/2}$ disminuyó de 117 a 36-84 días en el caso del enantiómero *S* y de 71 a 25-55 días en el caso del enantiómero *R* por la adición de los residuos (Tabla 4.15). Este hecho pudo deberse a

un incremento en la actividad microbiana del suelo y también a competencia entre el fungicida y la materia orgánica proporcionada por las enmiendas por los sitios de adsorción, lo cual pudo llevar a un aumento de la cantidad de metalaxil biodisponible para ser degradado (Fernandes et al., 2006). Las diferencias en la velocidad de degradación entre las dos enmiendas pudieron deberse al distinto carácter de la materia orgánica que aporta cada una de ellas. Así, la materia orgánica soluble del ALP presentaba moléculas de bajo peso molecular, polares y no humificadas que se adsorben con mayor facilidad en los componentes minerales del suelo que las moléculas de mayor peso molecular, más complejas y altamente humificadas presentes en el ALPc (Fernandes et al., 2006). Los valores de EF del suelo S1 enmendado con ALP y ALPc al final del experimento de incubación indicaron una moderada enantioselectividad del proceso de degradación (Figura 4.18). Los valores de ES obtenidos para dicho suelo tratado con ALP (ES= 0.19) y ALPc (ES= 0.21) confirmaron la baja enantioselectividad observada en las fracciones enantioméricas (Tabla 4.15).

En el caso del suelo S2 enmendado con ALP, la degradación del enantiómero *R* fue más lenta, mientras que la del enantiómero *S* fue más rápida en comparación con el suelo sin tratar. El $t_{1/2}$ del enantiómero *R* aumentó de 18 a 38 días, mientras que el del enantiómero *S* disminuyó de 122 a 65 días (Tabla 4.16). Esto hizo que la degradación resultase menos enantioselectiva que en el suelo sin enmendar, como reflejan los valores de EF= 0.60 al final del periodo de incubación y de ES= 0.27 respecto a los valores para el suelo sin enmendar (EF= 0.83, ES= 0.73). Este comportamiento debe relacionarse con cambios en la población microbiana tras la enmienda, la presencia de nuevas fuentes de C para los microorganismos y/o incluso a un posible efecto tóxico del ALP para los microorganismos degradadores del enantiómero *R* del metalaxil (Gámiz et al., 2013). Al enmendar el suelo S2 con ALPc, ambos enantiómeros fueron degradados más lentamente que en el suelo sin enmendar. Esta desaceleración de la degradación puede atribuirse a la ligera mayor adsorción del metalaxil en los suelos enmendados con ALPc (Tabla 4.12). Además, el proceso de compostaje dio lugar a una reducción de materia orgánica lábil y soluble, así como un aumento del pH (Tabla 4.4). Es conocido que el pH puede afectar a la estructura de las comunidades microbianas del suelo incluida la relación hongo:bacteria y la distribución de grupos taxonómicos y funcionales (Bending &

Rodríguez-Cruz, 2007), por lo que la variación del pH del ALPc pudo afectar a la población microbiana degradadora de metalaxil.

La Tabla 4.17 muestra que el valor de K_d obtenido en el t_0 para el suelo S1 enmendado con ALP fue muy similar al obtenido para el suelo sin enmendar, lo cual es indicativo de que el ALP no afectó la adsorción del metalaxil en el suelo S1. En el caso de la enmienda con ALPc, el valor fue ligeramente superior lo cual está de acuerdo con la leve mayor adsorción del metalaxil observada en el experimento de adsorción. En el suelo S2, la enmienda con los adsorbentes orgánicos no supuso diferencias importantes en el valor de K_d a tiempo 0, lo cual confirmó los resultados de adsorción obtenidos en los que el tratamiento con ALP y ALPc no afectó la adsorción de los enantiómeros del metalaxil. A medida que aumentó el tiempo de incubación, el valor de K_d aumentó para ambos enantiómeros. El hecho de que este efecto fuera más pronunciado para los sistemas en los que la degradación fue más rápida (Tabla 4.17) apoya que a medida que los hace desaparecer de la disolución, la biodegradación provocó una acumulación de los enantiómeros del plaguicida en la fase adsorbida, aumentando el valor de K_d (Cox & Walker, 1999).

4.2.2.3. Persistencia en los suelos enmendados con organo-hidrotalcita

La Figura 4.19 muestra las curvas de disipación de los enantiómeros *S* y *R* del metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con la organo-hidrotalcita HT-ELA al 0.5% y al 1%. La adición de HT-ELA al suelo S1 en un porcentaje del 0.5% no supuso cambios importantes en la persistencia de los enantiómeros del metalaxil al compararlo con el suelo sin enmendar (Figura 4.19). Sin embargo, se observó que al aumentar la proporción de HT-ELA al 1%, la velocidad de degradación de ambos enantiómeros disminuyó significativamente. En el caso del suelo S2, la adición de HT-ELA en un porcentaje del 0.5% fue suficiente para observar un aumento en la persistencia de los enantiómeros, la cual se incrementó considerablemente al aumentar el porcentaje de organo-hidrotalcita hasta un 1%. La disminución de la velocidad de degradación de los enantiómeros al tratar ambos suelos con HT-ELA se atribuye al gran aumento de la adsorción del fungicida en los suelos enmendados, especialmente en el caso del suelo S2, ya que al aumentar la retención hay una menor cantidad de metalaxil disponible en el suelo para su biodegradación.

Se observó que los valores de EF a lo largo del tiempo de incubación del suelo S1 sin enmendar y enmendado con HT-ELA permanecieron aproximadamente constantes y cercanos a 0.5, lo cual indica una baja enantioselectividad del proceso de degradación tanto en el suelo sin enmendar como en el suelo enmendado. En el caso del suelo S2, cuanto mayor fue el porcentaje de enmienda, menor fue la enantioselectividad de la degradación del fungicida. Este hecho fue también consecuencia de la mayor capacidad de adsorción del suelo enmendado con la organo-hidrotalcita, ya que cuanto más retenido esté el fungicida, más lenta será la degradación y más prolongada su presencia en forma racémica (Celis et al., 2013).

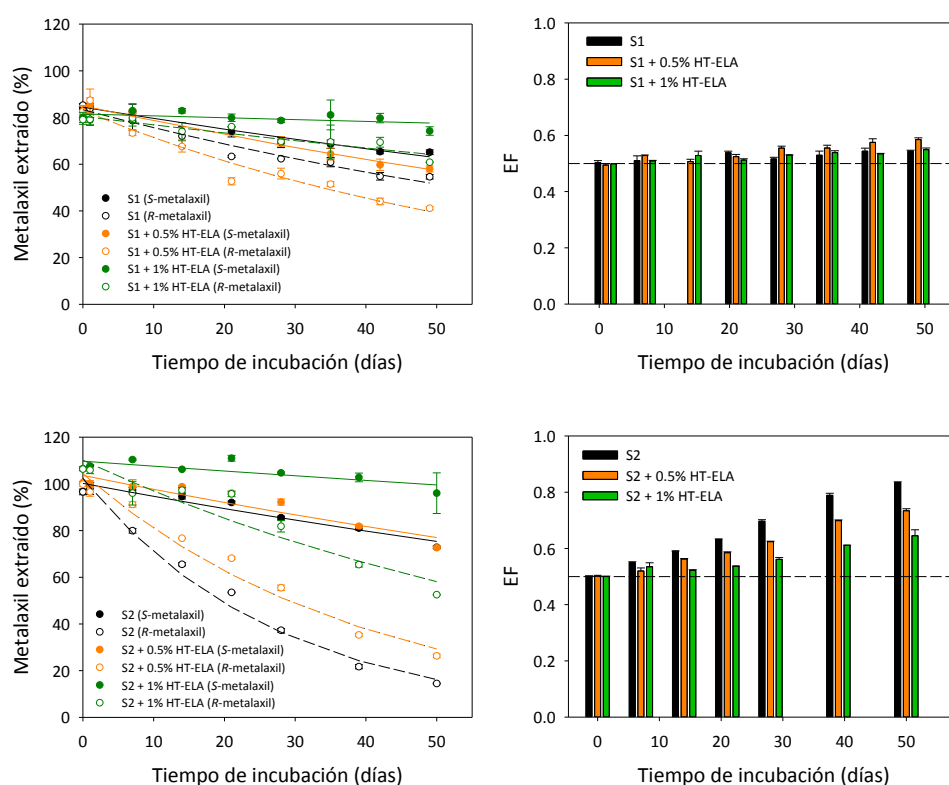


Figura 4.19. Curvas de disipación de los enantiómeros S- y R-metalaxil y los cambios en EF durante el periodo de incubación de *rac*-metalaxil en los suelos S1 y S2 enmendados con HT-ELA (0.5% y 1%). En las curvas de disipación, los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

Al igual que se observó en los suelos sin enmendar, para ambos suelos y tras aplicar cualquiera de los tratamientos (ALP, ALPc y HT-ELA), el valor del tiempo de vida media que se obtuvo considerando al metalaxil como un compuesto aquiral (suma de enantiómeros *R*+*S*) es intermedio entre los valores obtenidos para el enantiómero que se degrada más rápidamente (*R*-metalaxil) y para el más persistente (*S*-metalaxil). Esto supone que cuando se aplica el fungicida como mezcla racémica y se analiza como un solo compuesto, los valores de persistencia proporcionan una información parcial que no tiene en cuenta las diferentes velocidades de degradación que presentan el enantiómero biológicamente activo (*R*-metalaxil) y el inactivo (*S*-metalaxil).

Los valores de K_d determinados para ambos suelos enmendados con HT-ELA a lo largo del experimento de incubación se recogen en la Tabla 4.17. Se observa que los suelos tratados con la organo-hidrotalcita presentaron valores de K_d muy superiores a los de los correspondientes suelos sin enmendar o enmendados con los residuos orgánicos. Estos resultados están de acuerdo con la mayor adsorción del metalaxil observada en los experimentos de adsorción con los suelos tratados con HT-ELA (Tabla 4.11 y 4.12). Al aumentar el tiempo de incubación, el valor de K_d disminuyó, es decir, que la concentración de metalaxil en disolución aumentó hasta llegar a ser incluso superior a la cantidad adsorbida en el suelo en el caso del suelo S2 enmendado. Este hecho puede atribuirse a la alta reversibilidad del proceso de adsorción del fungicida en los suelos tratados con HT-ELA (Tabla 4.13 y 4.14). Otro posible motivo que puede contribuir a la disminución del valor de K_d es la pérdida de capacidad de adsorción de la organo-hidrotalcita con el tiempo, probablemente por las interacciones de la HT-ELA con componentes solubles o con microorganismos del suelo (Gámiz et al., 2010).

4.2.2.4. Estudio de la persistencia bajo aplicaciones sucesivas

En el suelo S2 sin enmendar se llevó a cabo un nuevo experimento de incubación de *rac*-metalaxil adicionando una segunda dosis de 2 mg/kg tras finalizar la primera incubación. Las curvas de disipación de cada uno de los enantiómeros para las aplicaciones sucesivas de metalaxil se muestran en la Figura 4.20, junto con la variación del parámetro EF a lo largo del experimento de incubación.

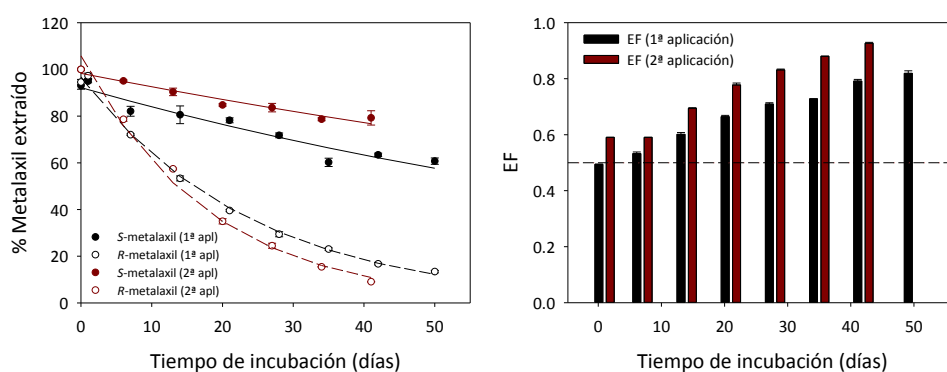


Figura 4.20. Curvas de disipación tras dos aplicaciones sucesivas de *rac*-metalaxil al suelo S2 y los cambios en la fracción enantiomérica (EF) con el tiempo durante el experimento de incubación. En las curvas de disipación, los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

Los datos experimentales se ajustaron a una cinética de primer orden obteniéndose los parámetros que se resumen en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18. Constantes del ajuste de los datos experimentales de disipación de metalaxil en suelo S2 a una cinética de primer orden.

		k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	R^2	ES
1ª Aplicación	S-metalaxil	0.0094 ± 0.0010	74	0.929	0.63
	R-metalaxil	0.0415 ± 0.0009	17	0.997	
	(S+R)-metalaxil	0.0208 ± 0.0013	33	0.976	
2ª Aplicación	S-metalaxil	0.0060 ± 0.0006	116	0.954	0.80
	R-metalaxil	0.0555 ± 0.0026	12	0.990	
	(S+R)-metalaxil	0.0178 ± 0.0011	39	0.979	

La segunda aplicación del metalaxil supuso un aumento de la persistencia del enantiómero *S* y una disminución de la persistencia del enantiómero *R* al compararla con los resultados de la primera incubación. El aumento de la velocidad de degradación del *R*-metalaxil tras la segunda aplicación pudo ser consecuencia de una adaptación microbiana que condujo a un metabolismo más rápido de este enantiómero (Cox et al., 1996). Por otro lado, el aumento de la persistencia del enantiómero *S* puede atribuirse a la toxicidad sobre la población microbiana degradadora de este enantiómero o de sus metabolitos, así como a un agotamiento de la materia orgánica fácilmente degradable que puede ser utilizada por los microorganismos degradadores como alimento (Cox et al., 1996; Motonaga et al., 1998). Una explicación adicional para el aumento de la persistencia del enantiómero *S* al aumentar el número de aplicaciones del fungicida es que la cantidad de *S*-metalaxil residual que permanece en el suelo tras la primera incubación podría encontrarse en una forma fuertemente adsorbida o alcanzado zonas de difícil acceso para los microorganismos, como pequeños poros. De ser así, esta fracción residual se degradaría más lentamente que la cantidad adicionada en la segunda aplicación, dando lugar a una degradación bifásica, con una fase más rápida correspondiente al compuesto añadido en la segunda aplicación y una más lenta correspondiente al residual de la primera aplicación (Celis et al., 2015b).

Los valores de ES calculados (Tabla 4.18) indicaron un aumento de la enantioselectividad de la degradación tras la segunda aplicación del fungicida. Esto se debió a que la segunda aplicación condujo a una disminución de la velocidad de degradación del enantiómero más persistente y una aceleración de la degradación del enantiómero menos persistente. Esto llevó a que las diferencias en la velocidad de disipación fueran mayores y, con ello, la enantioselectividad.

4.2.2.5. Estudio de persistencia a elevadas dosis

Dado que en algunos cultivos el metalaxil se aplica a elevadas dosis de hasta 10-20 kg/ha, se realizó un experimento de persistencia usando suelo S2 e incrementando la dosis de aplicación del fungicida a 20 mg/kg. Las curvas de disipación para el *S*-metalaxil y el *R*-metalaxil se han representado en la Figura 4.21, junto con la variación del parámetro EF con el tiempo de incubación.

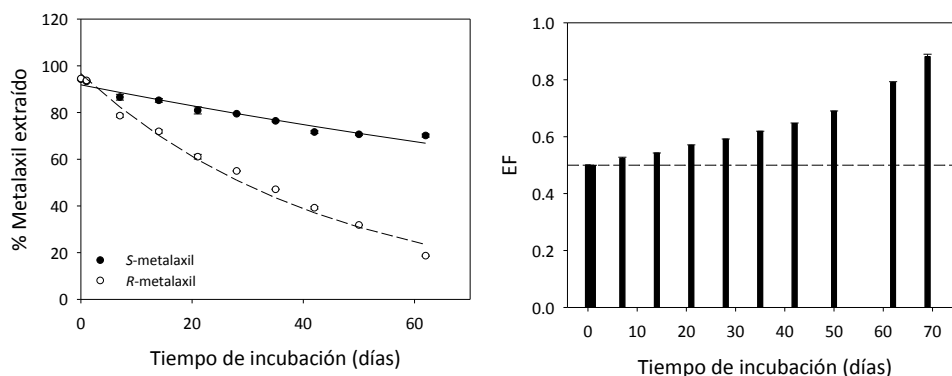


Figura 4.21. Curvas de disipación de los enantiómeros *S*- y *R*-metalaxil y cambios en EF durante el periodo de incubación de *rac*-metalaxil en el suelo S2 con una dosis de aplicación de 20 mg/kg. En las curvas de disipación, los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

Los datos experimentales se ajustaron a una cinética de primer orden obteniéndose los valores que se resumen en la Tabla 4.19.

Tabla 4.19. Constantes del ajuste de los datos experimentales de disipación de metalaxil en suelo S2 (20 mg/kg) a una cinética de primer orden.

	k_d (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	R^2	ES
<i>S</i> -metalaxil	0.0051 ± 0.0004	136	0.951	0.63
<i>R</i> -metalaxil	0.0228 ± 0.0012	30	0.982	
(<i>S</i> + <i>R</i>)-metalaxil	0.0120 ± 0.0003	58	0.995	

Ambos enantiómeros fueron ligeramente más persistentes al aplicar el fungicida a una dosis de 20 mg/kg (Tabla 4.19) que al adicionarlo a una dosis de 2 mg/kg ($t_{1/2}$ = 122 días *S*-metalaxil y 18 días para *R*-metalaxil, Tabla 4.16). Este cambio en la degradación pudo deberse al efecto tóxico del fungicida sobre parte de los

microorganismos degradadores de metalaxil. Monkiedje et al. (2002) estudiaron el efecto de la adición de diferentes dosis de metalaxil en un rango de 0-1000 mg/kg sobre la actividad microbiana. A partir de este trabajo se concluyó que el metalaxil añadido a grandes dosis ejercía un efecto adverso en las propiedades biológicas del suelo. Este efecto se observó en la disminución de la población de bacterias fijadoras de nitrógeno y en alteraciones en actividades enzimáticas (deshidrogenasa, β -glucosidasa y fosfatasa), entre otros indicadores biológicos que afectaban al crecimiento microbiano. Algunas de estas alteraciones ya eran observables a dosis de 20 mg/kg, por lo que es posible que este fuera el motivo de las diferencias en la velocidad de degradación de los enantiómeros al aplicar dicha dosis.

Tanto el valor de $EF = 0.88$ como el de $ES = 0.67$, confirmaron una alta enantioselectividad de la degradación. Estos valores fueron muy similares a aquellos obtenidos en el experimento de incubación realizado con una dosis de aplicación del fungicida de 2 mg/kg ($EF = 0.83$; $ES = 0.74$).

Para cada día de muestreo, se midió la concentración de cada enantiómero del metalaxil en una alícuota de la disolución de suelo obtenida a partir de muestras de incubaciones en tubos Pall y se determinaron las constantes de distribución, así como las fracciones enantioméricas en la disolución (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. Constantes de distribución de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-metalaxil en la incubación del suelo S2 con una dosis de aplicación de 20 mg/kg.

Tiempo (días)	$K_d S$ (l/kg)	$K_d R$ (l/kg)	$K_d (S+R)$ (l/kg)	EF
0	0.91 ± 0.05	0.91 ± 0.05	0.91 ± 0.05	0.50 ± 0.00
1	0.80 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.50 ± 0.00
7	0.60 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.53 ± 0.00
14	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.54 ± 0.00
21	0.87 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.57 ± 0.00
28	0.87 ± 0.01	0.81 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.60 ± 0.00
35	0.95 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.91 ± 0.02	0.62 ± 0.00
42	0.97 ± 0.00	0.87 ± 0.00	0.93 ± 0.00	0.65 ± 0.00
50	0.90 ± 0.00	0.79 ± 0.00	0.86 ± 0.00	0.70 ± 0.00
62	0.96 ± 0.03	0.80 ± 0.00	0.92 ± 0.03	0.80 ± 0.00

Los valores de K_d obtenidos en la incubación con una dosis de metalaxil añadida de 20 mg/kg (Tabla 4.20) fueron prácticamente el doble de los valores calculados en la incubación a una dosis de 2 mg/kg (Tabla 4.17). Estos resultados indicaron una mayor adsorción en el suelo de los enantiómeros del metalaxil a altas dosis, lo que está de acuerdo con el carácter S de las isothermas de adsorción de los mismos en los suelos estudiados (Tabla 4.12). Además, se observó que los valores de K_d (a excepción del día 7 de muestreo) fueron relativamente constantes a lo largo del tiempo de incubación ($K_d = 0.97\text{-}0.73$ l/kg para el enantiómero S y $K_d = 0.91\text{-}0.72$ l/kg en el caso del enantiómero R). Este resultado contrasta con el aumento observado en el valor de K_d para el enantiómero R en el experimento realizado a menor dosis de aplicación (Tabla 4.17). Es posible que dicho aumento en el valor de K_d se pudiera haber visto compensado por otros procesos como el mayor carácter S de las isothermas a elevadas concentraciones (que implica una menor adsorción a medida que el fungicida va desapareciendo por degradación) o por la menor velocidad de degradación del enantiómero observado a elevadas dosis, que reduce su acumulación en fase adsorbida. El valor de EF varió desde EF= 0.5 en el día 0 hasta 0.87 al final del periodo de incubación, valores similares a los obtenidos en las incubación con dosis de aplicación de 2 mg/kg. .

4.2.3. Estudios de lixiviación en condiciones de laboratorio

En este estudio se evaluó la enantioselectividad del proceso de lixiviación del metalaxil en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con los diferentes adsorbentes en columnas de suelos empaquetadas a mano. En el caso del ALP y el ALPc, la enmienda se aplicó en toda la columna al 2%, mientras que la muestra de HT-ELA se mezcló con los 2.5 primeros cm de la columna en proporciones del 0.5% y 1%. Tras ser saturadas las columnas con agua, se trataron con una dosis de fungicida equivalente a la dosis de campo (2 kg/ha). Diariamente, se adicionó a las columnas 15 ml de agua, se dejó percolar durante 24 h y los lixiviados se recogieron y analizaron por HPLC. A partir de los datos obtenidos en los análisis, se elaboraron las curvas de elución relativa, en las que se representa la concentración de metalaxil lixiviado diariamente, y las curvas de elución acumulada, en las que se representa el porcentaje acumulado de fungicida recuperado durante el experimento.

4.2.3.1. Lixiviación en los suelos sin enmendar

La Figura 4.22 muestra las curvas de elución relativas y acumuladas de los enantiómeros *R* y *S* para ambos suelos sin enmendar. En las curvas relativas se ha incluido la fracción enantiomérica (EF) de los lixiviados recogidos durante el experimento de lixiviación.

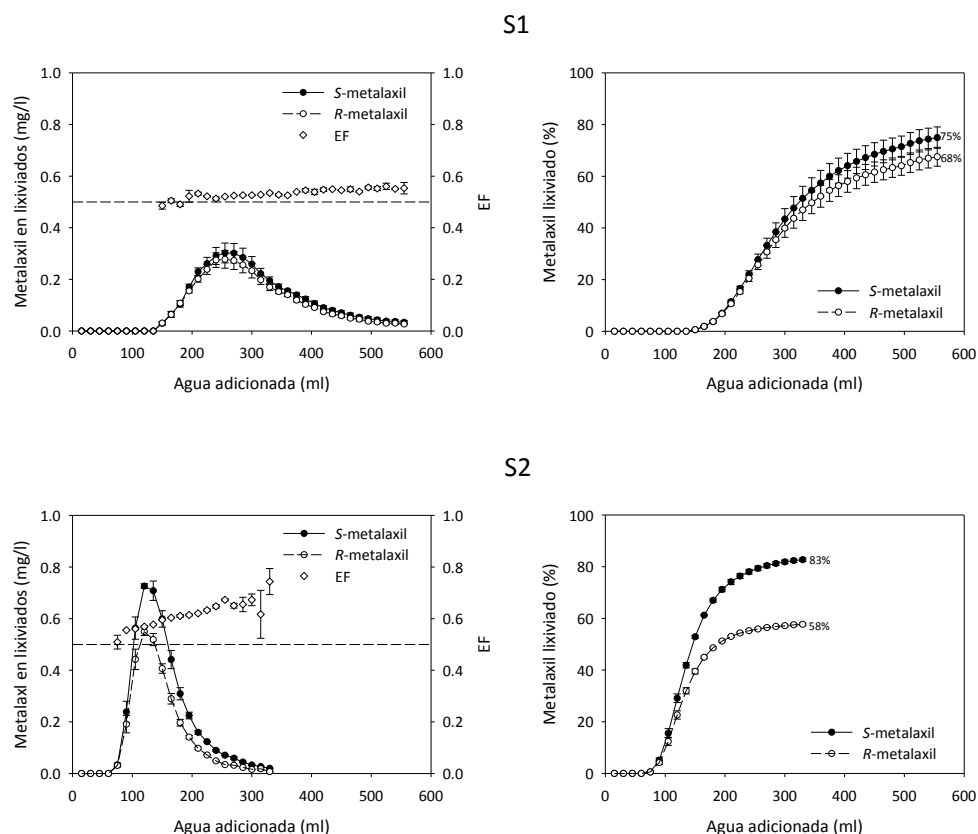


Figura 4.22. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros de metalaxil aplicados como mezcla racémica a columnas de suelos sin enmendar. Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en la curvas relativas.

Para ambos suelos, se observó que los dos enantiómeros lixiviaron a la misma velocidad a través de la columna. Este hecho confirmó los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción, en los que no se apreciaba enantioselectividad en la adsorción de los enantiómeros (apartado 4.2.1.2), ya que una adsorción

enantioselectiva hubiera dado como resultado que un enantiómero hubiera lixiviado antes que el otro. Por otro lado, la concentración máxima de *S*-metalaxil en ambos suelos fue mayor a la del enantiómero *R*. Esta diferencia de concentraciones fue debido a la mayor persistencia del *S*-metalaxil en estos suelos, lo cual quedó confirmado en las curvas de elución acumulada donde el porcentaje total lixiviado es superior en el caso de este enantiómero.

La lixiviación de ambos enantiómeros del metalaxil fue más lenta en el suelo S1 que en el suelo S2. En el caso del suelo S1 el máximo de concentración (C_{\max}) apareció tras añadir 255 ml de agua mientras que en el suelo S2 la C_{\max} apareció a 120 ml. Además, la forma achatada de la curva de elución relativa del suelo S1 también es indicativa de una lixiviación más lenta de los enantiómeros en este suelo. Este importante retardo puede atribuirse a la mayor adsorción del metalaxil en el suelo S1, así como al predominio de poros de pequeño tamaño en este suelo que hace que los enantiómeros del fungicida retrasen su movimiento a través de las columnas. Los porcentajes totales de lixiviación de cada enantiómero indicaron que la enantioselectividad de la lixiviación fue más pronunciada en el caso del suelo S2. Esto fue consecuencia directa de la mayor degradación enantioselectiva del metalaxil en este suelo.

En la Tabla 4.21 se han incluido los valores de la fracción enantiomérica global (EF_{global}), que representa la enantioselectividad del proceso de lixiviación del conjunto de todos los lixiviados. Estos valores muestran una mayor enantioselectividad en la lixiviación del metalaxil en el suelo S2 ($EF_{\text{global}} = 0.59$) que en el suelo S1 ($EF_{\text{global}} = 0.52$), lo cual revela que en un supuesto caso real, las aguas subterráneas acumuladas por la lixiviación estarían enriquecidas en el enantiómero *S* y que dicho enriquecimiento estaría más acentuado en el caso del suelo franco-arenoso (S2).

Tabla 4.21. Porcentaje de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-metalaxil lixiviado (Lx), extraído de las columnas (Ext) y no recuperado (No rec) durante el experimento de lixiviación en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP, ALPc y HT-ELA. También se han incluido en la tabla la concentración máxima del fungicida en los lixiviados ($C_{\text{máx}}$), el volumen al que apareció dicha concentración máxima ($V_{\text{máx}}$), así como la fracción enantiomérica global (EF_{global}).

Tratamientos		Lx	Ext	No rec	$C_{\text{máx}}$	$V_{\text{máx}}$	EF_{global}
		-----	(%)	-----	(mg/l)	(l)	
S1	<i>S</i>	75	6	19	0.30	255	0.52
	<i>R</i>	68	17	15	0.28	255	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	71	12	18	0.58	255	
S1 + 2% ALP	<i>S</i>	71	25	4	0.40	210	0.51
	<i>R</i>	67	12	21	0.39	210	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	69	19	12	0.80	210	
S1 + 2% ALPc	<i>S</i>	78	4	18	0.48	240	0.52
	<i>R</i>	72	15	13	0.47	240	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	75	9	16	0.95	240	
S1 + 0.5% HT-ELA	<i>S</i>	68	11	21	0.24	285	0.53
	<i>R</i>	60	20	20	0.22	285	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	64	16	20	0.46	285	
S1 + 1% HT-ELA	<i>S</i>	58	20	22	0.18	pd ^a	0.53
	<i>R</i>	51	26	23	0.16	pd	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	55	23	22	0.34	pd	
S2	<i>S</i>	83	< 1	17	0.73	120	0.59
	<i>R</i>	58	< 1	42	0.55	120	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	70	< 1	30	1.28	120	
S2 + 2% ALP	<i>S</i>	92	< 1	8	0.75	120	0.55
	<i>R</i>	76	< 1	24	0.70	120	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	84	< 1	16	1.47	120	
S2 + 2% ALPc	<i>S</i>	82	< 1	18	0.82	135	0.57
	<i>R</i>	62	< 1	38	0.64	135	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	72	< 1	28	1.47	135	
S2 + 0.5% HT-ELA	<i>S</i>	74	< 1	26	0.46	135	0.59
	<i>R</i>	51	< 1	49	0.33	135	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	65	< 1	35	0.79	135	
S2 + 1% HT-ELA	<i>S</i>	63	12	25	0.32	pd	0.61
	<i>R</i>	40	12	48	0.21	pd	
	(<i>S</i> + <i>R</i>)	52	12	36	0.52	pd	

^a poco definido

4.2.3.2. Lixiviación en los suelos enmendados con los residuos de almazara

Las Figuras 4.23 y 4.24 muestran las curvas de elución relativas y acumuladas de los enantiómeros del metalaxil en los suelos S1 y S2 enmendados con los residuos de almazara ALP y ALPc.

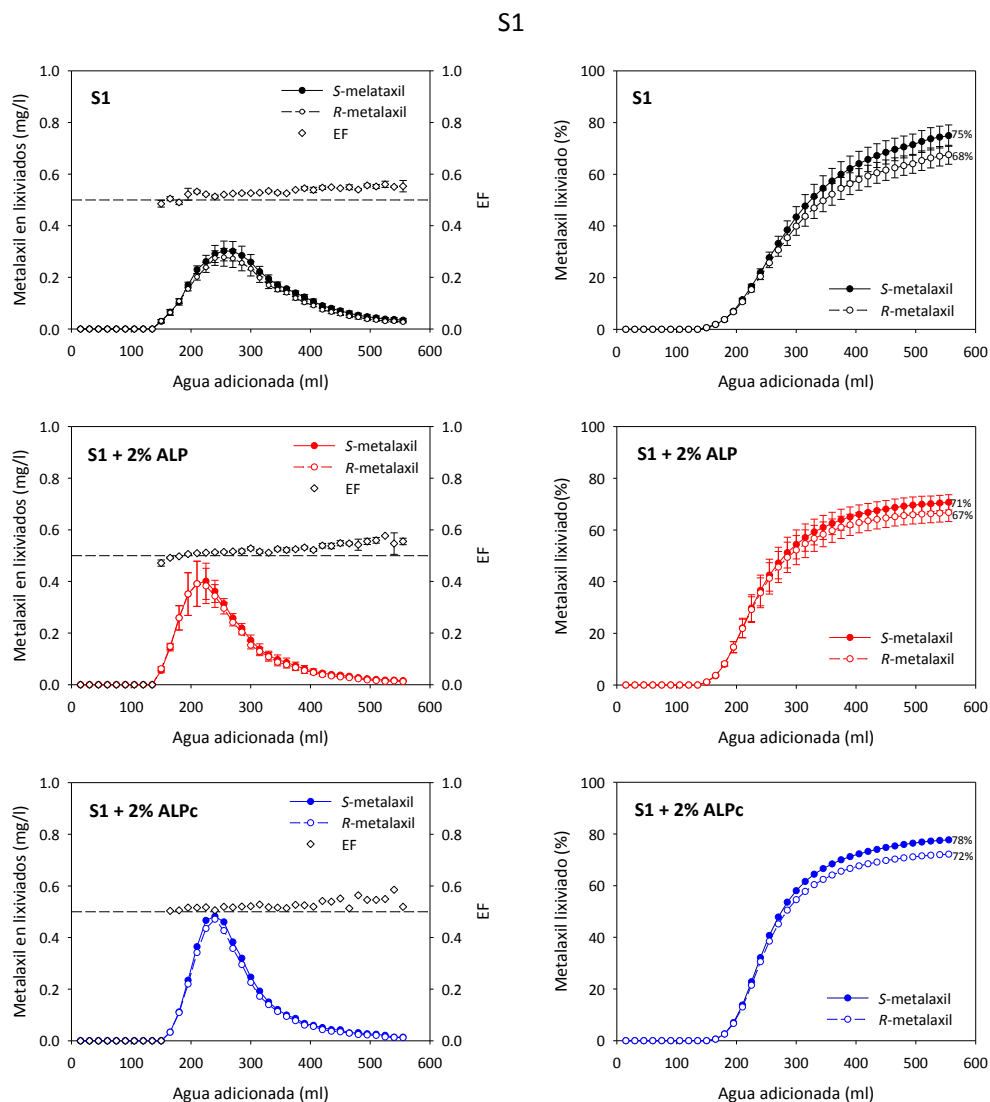


Figura 4.23. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros de metalaxil aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP (2%) y ALPc (2%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

S2

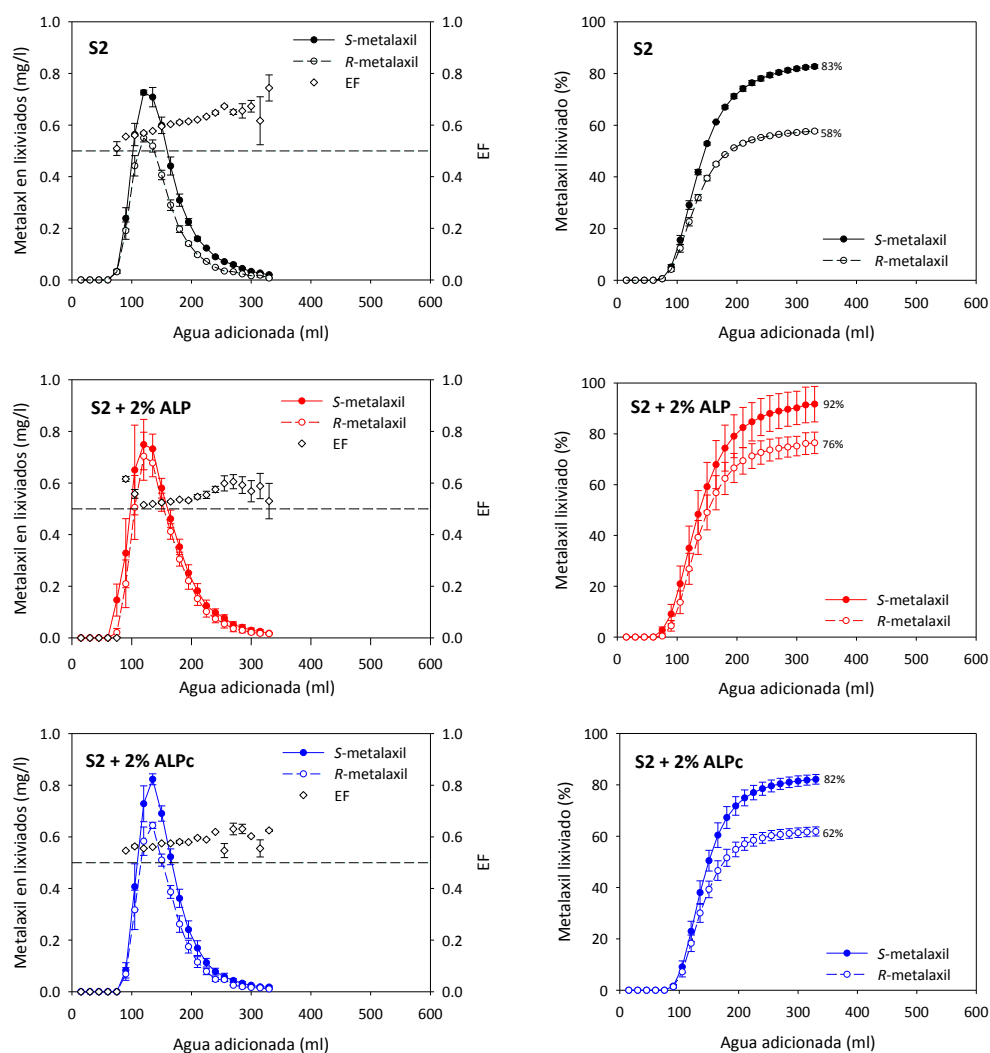


Figura 4.24. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros de metalaxil aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP (2%) y ALPc (2%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

En el suelo S1 se observó que la adición tanto de ALP como de ALPc supuso un ligero adelanto en la lixiviación de los enantiómeros a través de la columna si se compara con el suelo sin enmendar (Tabla 4.21). Este aumento en la velocidad de lixiviación puede atribuirse a la competencia por los sitios de adsorción en el suelo entre el metalaxil y la materia orgánica proporcionada por las enmiendas. De este

modo, los enantiómeros del metalaxil estarían más biodisponibles en el suelo enmendado favoreciéndose su lixiviación. Otro motivo que pudo acelerar la lixiviación del metalaxil en el suelo tratado es que la presencia de materia orgánica soluble hubiera inducido la formación de complejos con el fungicida facilitando su movimiento vertical (Fenoll et al., 2015). Para evaluar el posible efecto de dicha materia orgánica soluble, se midió el contenido de carbono orgánico en los lixiviados recogidos durante los primeros 10 días de experimento (Figura 4.25). Se observa en esta figura que en los 5 primeros días, el contenido de materia orgánica soluble fue significativamente superior en las columnas de suelo enmendadas con ALP, seguidas por aquellas de suelo tratado con ALPc y finalmente por las columnas de suelo S1 sin enmendar. De este modo, la materia orgánica soluble pudo haber contribuido en la más rápida lixiviación de los enantiómeros del metalaxil en los suelos tratados con los residuos de almazara. Las curvas de elución acumuladas indican que los porcentajes totales de cada enantiómero de metalaxil lixiviado fueron similares en el suelo S1 enmendado con los residuos de almazara y en el suelo S1 sin enmendar. Esto es indicativo de una baja enantioselectividad de la lixiviación del metalaxil, así como de un efecto poco significativo de las enmiendas orgánicas en esta enantioselectividad. Esta baja enantioselectividad también quedó confirmada con los valores de EF_{global} cercanos a 0.5 obtenidos para el suelo S1 tratado con ambos residuos de almazara (Tabla 4.21).

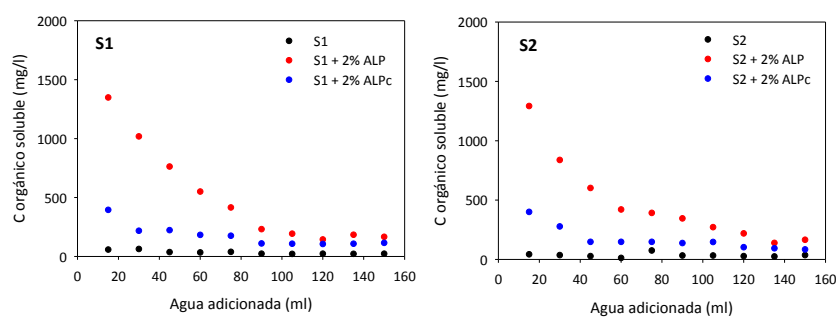


Figura 4.25. Concentración de C orgánico soluble en los lixiviados de las columnas de suelo S1 y S2 sin enmendar y enmendados con ALP y ALPc.

En el suelo S2, el tratamiento con los residuos orgánicos no supuso grandes cambios en la velocidad de lixiviación de los enantiómeros, apareciendo la $C_{m\acute{a}x}$ a volúmenes de agua adicionada similares al observado en el suelo sin enmendar. Sin embargo, sí se apreciaron importantes diferencias en la $C_{m\acute{a}x}$ de los enantiómeros, siendo estas diferencias más pronunciadas en el caso de las columnas del suelo enmendado con ALPc que del suelo tratado con ALP. Estos resultados se atribuyen a la mayor enantioselectividad de la degradación del metalaxil en los suelos enmendados con el alperujo compostado, como se observó en los experimentos de disipación. Las curvas de elución acumulada confirmaron estas observaciones. Así, los valores de *S*-metalaxil total lixiviado en el suelo S2 enmendado con ALP y ALPc fueron similares al del suelo sin enmendar. Esto se debió a que el tiempo de residencia de este enantiómero en las columnas de suelo (15 días) no fue suficiente para observar diferencias en la degradación en el suelo sin enmendar y enmendado con los residuos de almazara. Sin embargo, en el caso del enantiómero *R* se obtuvo un porcentaje lixiviado superior en el suelo S2 enmendado con ALP, seguido del suelo tratado con ALPc y finalmente por el suelo sin enmendar, al ser la degradación de este enantiómero más rápida. Estas marcadas diferencias en la enantioselectividad de la disipación de los enantiómeros del metalaxil durante el proceso de lixiviación se vieron reflejadas en los valores de EF_{global} , los cuales siguieron el orden: $S2 > S2 + ALPc > S2 + ALP$.

Como en el caso del suelo S1, se midió la concentración de C orgánico soluble de los lixiviados de los primeros 10 días para comprobar si el contenido de materia orgánica soluble pudo afectar al movimiento vertical de los enantiómeros a través de la columna (Figura 4.25). Se observaron resultados similares a los obtenidos en el suelo S1, es decir, la cantidad de C orgánico soluble fue mayor en el suelo tratado con ALP fresco seguido del suelo tratado con ALPc y finalmente del suelo sin enmendar. Sin embargo, esta mayor cantidad de materia orgánica no supuso un aumento en la velocidad de lixiviación en el suelo enmendado con los residuos orgánicos.

4.2.3.3. Lixiviación en los suelos enmendados con organo-hidrotalcita

Las curvas de elución tanto relativas como acumuladas para las columnas de suelo S1 y S2 enmendadas con HT-ELA a los porcentajes del 0.5 y 1% se representan en las Figuras 4.26 y 4.27.

S1

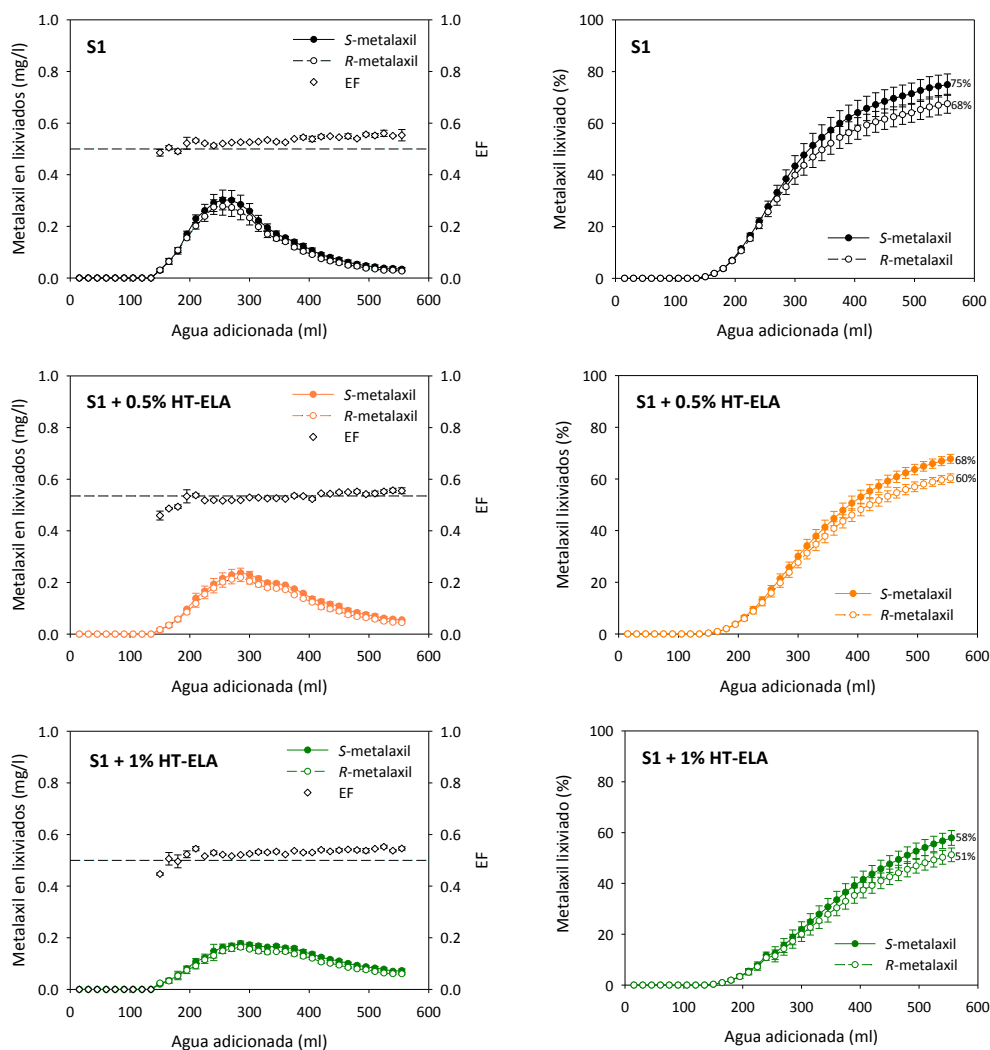


Figura 4.26. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros de metalaxil aplicados como mezcla racémica a columnas de suelo S1 sin enmendar y enmendado con HT-ELA (0.5% y 1%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

S2

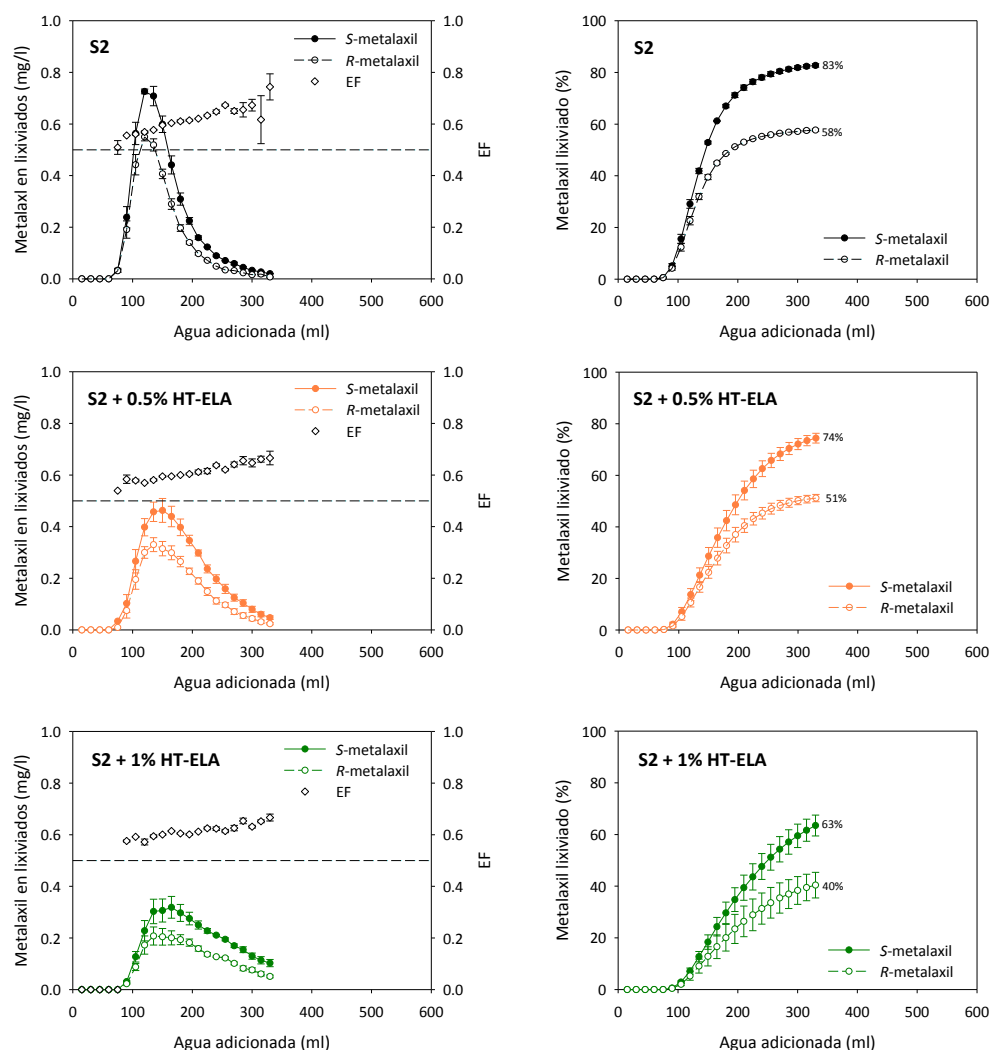


Figura 4.27. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros de metalaxil aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S2 sin enmendar y enmendado con HT-ELA (0.5% y 1%) Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

La adición de HT-ELA al suelo S1 en un porcentaje del 0.5% fue suficiente para observar un cierto retraso en la lixiviación de ambos enantiómeros a través de la columna (Figura 4.26, Tabla 4.21). Se aprecia que al aumentar el porcentaje de enmienda al 1% la lixiviación resultó mucho más lenta aún, lo cual se observa en las curvas más achatadas para ambos enantiómeros en los suelos enmendados a este

porcentaje. Esta lentitud en la lixiviación fue consecuencia de la alta adsorción del metalaxil en los suelos enmendados con HT-ELA (Tabla 4.11 y 4.12). El porcentaje total lixiviado en el suelo S1 enmendado con HT-ELA al 0.5% fue del 68% y del 60% para los enantiómeros *S* y *R*, respectivamente, mientras que en el suelo enmendado al 1% fue del 58% para el *S*-metalaxil y del 51% para el *R*-metalaxil (Figura 4.26). A partir de estos porcentajes de metalaxil lixiviado y de los porcentajes recuperados por extracción con metanol, se calculó el porcentaje de metalaxil no recuperado (Tabla 4.21). Teniendo en cuenta la alta persistencia de los enantiómeros en el suelo S1 enmendado con la organo-hidrotalcita, observada en los experimentos de incubación (apartado 4.2.2.3), el metalaxil no recuperado debió ser degradado tras atravesar la barrera de organo-hidrotalcita o quedar adsorbido fuertemente o atrapado en las partículas de suelo o de organo-hidrotalcita, de modo que no pudo ser extraído con metanol. Los valores de EF_{global} para el suelo S1 enmendado con HT-ELA a los porcentajes de 0.5 ($EF_{global}= 0.53$) y 1% ($EF_{global}= 0.53$) fueron muy similares al obtenido para el suelo sin enmendar ($EF_{global}= 0.52$), lo cual revela que el tratamiento con la organo-hidrotalcita no modificó la escasa enantioselectividad observada en el proceso de lixiviación del metalaxil en el suelo S1.

En el caso del suelo S2, el efecto de la adición de HT-ELA fue similar al observado en el suelo S1, es decir, hubo un retraso en la lixiviación de ambos enantiómeros al tratar el suelo con HT-ELA tanto al 0.5% como al 1% (Tabla 4.21). En este suelo enmendado con HT-ELA, la enantioselectividad de la lixiviación fue mayor al compararlo con el suelo S1 tratado con la organo-hidrotalcita, debido a la mayor enantioselectividad de la degradación del metalaxil en el suelo original ($EF_{global}= 0.59$ y 0.61 para los suelos tratados con HT-ELA en un porcentaje del 0.5 y 1% respectivamente). No obstante, la enantioselectividad en el suelo enmendado con HT-ELA fue similar a la del suelo S2 sin enmendar ($EF_{global}= 0.59$). Cabe destacar que en el suelo S2 sólo se recuperó fungicida residual por extracción con metanol en las columnas de suelo tratadas con HT-ELA al 1%. En el resto de los tratamientos el % de ambos enantiómeros extraídos del suelo fue < 0.1%. Puesto que la persistencia de los enantiómeros del metalaxil en este suelo fue menor, el porcentaje de metalaxil no recuperado puede atribuirse a la degradación.

4.2.4. Estudio del comportamiento enantioselectivo del metalaxil en un suelo agrícola bajo condiciones reales de campo: efecto de la adición de hidrotalcita modificada

Para estudiar el comportamiento enantioselectivo del metalaxil en un suelo agrícola, así como el efecto del tratamiento con una hidrotalcita modificada con oleato en condiciones de campo, se utilizaron 6 parcelas experimentales de un suelo franco-arenoso que hemos denominado S3 (Tabla 4.1). Tres de las parcelas sin enmendar fueron utilizadas como blanco y otras tres se enmendaron con la organo-hidrotalcita HT-OLE a una dosis de 2 t/ha, mezclándola con los 0-2 cm de suelo más superficiales. Se aplicó a cada una de las parcelas una dosis de metalaxil racémico de 6 kg/ha y se tomaron muestras de todas las parcelas a cuatro profundidades diferentes (0-5, 5-10, 10-20 y 20-30 cm) en los días 0, 35, 64 y 98 tras la aplicación del fungicida. Los días fueron seleccionados en función de las condiciones ambientales, que fueron monitorizadas durante todo el periodo de experimento en una estación meteorológica cercana a la finca experimental en la que se encontraban las parcelas (4 km). Las muestras fueron congeladas hasta su posterior extracción y análisis.

4.2.4.1. Condiciones meteorológicas

En la Figura 4.28 se presentan las temperaturas y lluvias acaecidas durante el experimento.

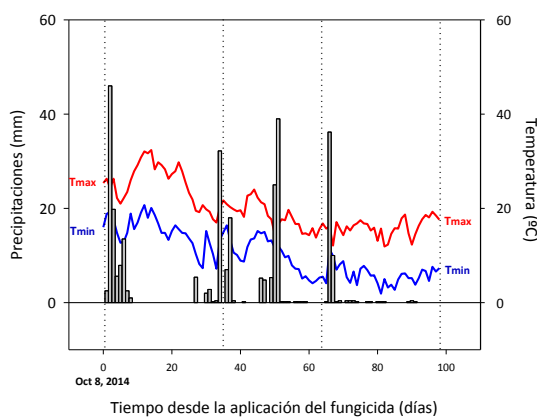


Figura 4.28. Datos de precipitaciones (barras) y temperaturas (líneas) registradas durante el experimento de campo. Las líneas verticales discontinuas corresponden a los días de toma de muestras.

Las temperaturas fueron relativamente altas para la época del año en la que se desarrolló el experimento (otoño-invierno). La temperatura máxima fluctuó entre 11.9 °C y 35.4 °C con una media de 19.9 °C mientras que la temperatura mínima osciló entre 2.7 °C y 20.7 °C con una media de 10.4 °C. Las precipitaciones totales durante los 98 días de experimento fueron de 298 mm con episodios de lluvias más intensas los días 2 (46 mm), 34 (32 mm), 51 (39 mm) y 66 (36 mm).

4.2.4.2. Lixiviación y persistencia en condiciones de campo

En la Figura 4.29 se muestran las concentraciones totales de (*S+R*)-metalaxil a distintas profundidades para los distintos tiempos de muestreo tras la aplicación del fungicida en las parcelas sin enmendar y enmendadas con la organo-hidrotalcita HT-OLE.

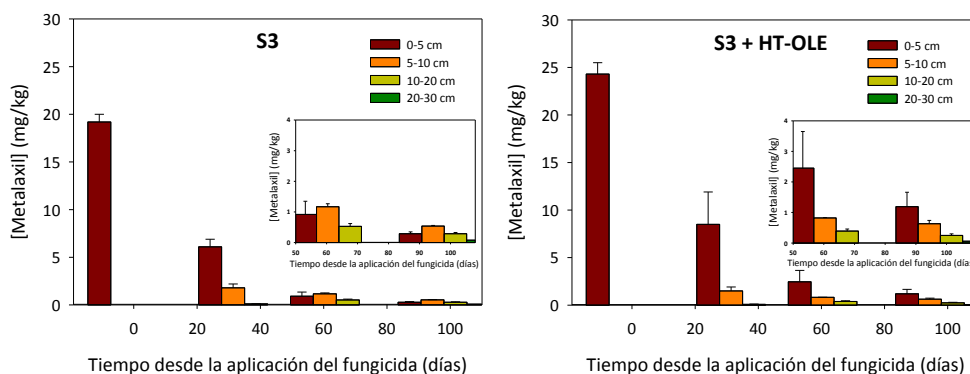


Figura 4.29. Concentración de metalaxil (mg/kg) a diferentes profundidades del suelo sin enmendar y enmendado con HT-OLE en los diferentes días de toma de muestra.

Al comienzo del experimento ($t=0$ días), se observó una mayor concentración de metalaxil en la sección de 0-5 cm del suelo enmendado con HT-OLE (24.3 mg/kg) que en el caso del suelo sin enmendar (19.2 mg/kg). Esta diferencia en las concentraciones del fungicida a tiempo 0 puede atribuirse a ligeras variaciones en la densidad del suelo tras la enmienda con la organo-hidrotalcita.

Lixiviación. Para estudiar la distribución del metalaxil a lo largo del perfil del suelo, se representó el porcentaje de fungicida presente a cada profundidad respecto al total en los 0-30 cm analizados (Figura 4.30).

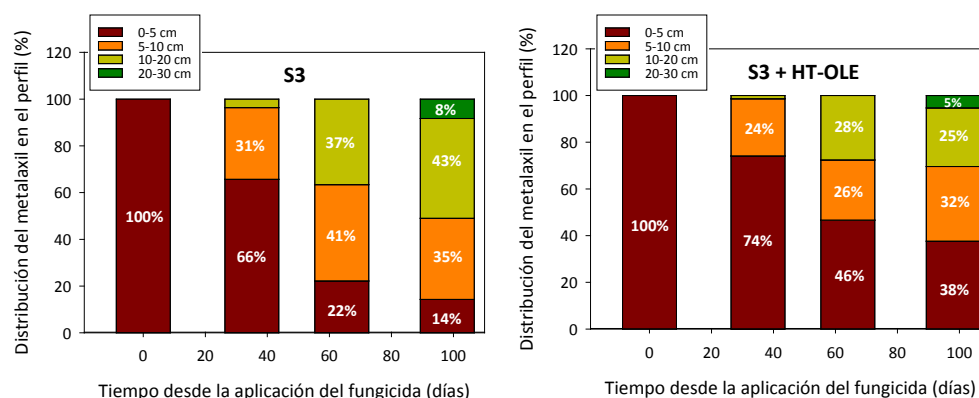


Figura 4.30. Distribución de los residuos de metalaxil (*S+R*) a diferentes profundidades del suelo sin enmendar y enmendado con HT-OLE en función del tiempo tras la aplicación del fungicida.

A los 35 días desde la aplicación del fungicida, ya se observó la aparición de metalaxil a profundidades de 5-10 cm y 10-20 cm, tanto en el suelo sin tratar como en el suelo tratado con HT-OLE. A este tiempo, las diferencias en la distribución del fungicida en el perfil del suelo no fueron importantes. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo desde que se produjo la aplicación, las diferencias en la distribución entre las parcelas sin enmendar y enmendadas fueron más significativas. Durante todo el experimento, los perfiles de las parcelas sin enmendar presentaron porcentajes de metalaxil superiores a profundidades mayores y concentraciones del fungicida en la superficie (0-5 cm) inferiores que en el caso del suelo tratado con HT-OLE. De este modo, en el último día de muestreo (día 98) se apreció que, para los primeros 20 cm de suelo, los residuos de metalaxil aumentaron con la profundidad en el suelo sin enmendar, mientras que disminuyeron con la profundidad en el caso del suelo enmendado. En esta toma, sólo un 14% de los residuos de metalaxil se localizaron en la toma más superficial (0-5 cm) del suelo sin enmendar, mientras que el suelo enmendado todavía retuvo un 38% de los residuos en dicho perfil (Figura 4.30). En este mismo día, ya se detectó la presencia del metalaxil a la profundidad de 20-30 cm en todas las parcelas, siendo el porcentaje del fungicida levemente mayor en el caso del suelo sin tratar. Estos datos indican que la utilización de la organo-

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hidrotalcita como enmienda ayuda a la inmovilización del metalaxil en la superficie, retrasando la lixiviación del fungicida a mayores profundidades. Dicha mayor retención se atribuye a la gran afinidad que presentó el metalaxil por la organo-hidrotalcita. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio preliminar de adsorción a una concentración de *rac*-metalaxil de 6 mg/l que se realizó en condiciones de laboratorio con el suelo S3 sin enmendar y enmendado con la organo-hidrotalcita a dos porcentajes (0.5% y 1%), en el que se observó que la adsorción del metalaxil aumentó con el porcentaje de HT-OLE añadido ($K_d = 0.34$ l/kg para el suelo sin enmendar y $K_d = 1.55$ y 3.14 l/kg para porcentajes de enmienda del 0.5 y 1%, respectivamente). Para confirmar este mecanismo, se tomaron muestras de suelo superficial (0-5 cm) ricas en partículas de HT-OLE de las correspondientes parcelas en el día 35, se extrajeron con metanol y midieron por HPLC. Los resultados mostraron que la concentración de metalaxil era muy superior en estas muestras de suelo enriquecidas con HT-OLE respecto a la media encontrada a la misma profundidad (0-5 cm) (Tabla 4.22).

Tabla 4.22. Concentración y valores de EF de los residuos de metalaxil en alícuotas de suelo ricas en partículas de adsorbente tomadas a una profundidad de 0-5 cm de las parcelas enmendadas con HT-OLE en el día 35 respecto a los valores medios para la misma profundidad.

	[Metalaxil] (mg/kg)	EF
Valor medio (0-5 cm) de HT-OLE	8.5 ± 3.4	0.536 ± 0.004
Alícuotas ricas en partículas de HT-OLE	72 ± 27	0.497 ± 0.008

Persistencia. Se estudió la disipación del metalaxil en los primeros 0-5 cm del suelo en las parcelas sin enmendar y en las parcelas enmendadas con HT-OLE. Para ello, se ajustaron los datos de concentración a la forma lineal de una cinética de primer orden:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Ec. 4.6}$$

donde C (mg/kg) y C_0 (mg/kg) son las concentraciones del fungicida en los 5 primeros cm del suelo al tiempo t (días) y $t = 0$ días respectivamente, y k (días^{-1}) es la constante de disipación. Los tiempos de disipación del 50% y del 90% se calcularon como $DT_{50} = 0.693/k$ y $DT_{90} = 2.303/k$, respectivamente.

Los parámetros calculados (Tabla 4.23) indican que la persistencia del metalaxil (*S+R*) fue mayor en el suelo enmendado con HT-OLE, con valores de DT_{50} = 22 días y DT_{90} = 72 días frente a los valores DT_{50} = 16 días y DT_{90} = 52 días para el suelo sin enmendar. Este aumento de la persistencia se atribuye a la alta adsorción del metalaxil en las parcelas enmendadas con la hidrotalcita modificada, ya que, además de retardar la lixiviación del fungicida, redujo la biodisponibilidad del mismo en el suelo para ser degradado.

Tabla 4.23. Parámetros de disipación para los enantiómeros del metalaxil (*S*- y *R*-metalaxil) y de la mezcla racémica (*S+R*)-metalaxil) en suelo sin enmendar y enmendado con HT-OLE a una profundidad de 0-5 cm.

		k (días)	TD ₅₀	TD ₉₀	R ²
S3	<i>S</i> -metalaxil	0.039 ± 0.004	18	60	0.984
	<i>R</i> -metalaxil	0.062 ± 0.007	11	37	0.975
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.044 ± 0.004	16	52	0.981
S3 + HT-OLE	<i>S</i> -metalaxil	0.028 ± 0.004	25	82	0.977
	<i>R</i> -metalaxil	0.037 ± 0.003	19	62	0.991
	(<i>S+R</i>)-metalaxil	0.032 ± 0.003	22	72	0.985

4.2.4.3. Composición enantiomérica de los residuos de metalaxil

Se evaluó el comportamiento enantioselectivo del metalaxil en el experimento de campo mediante el cálculo de la fracción enantiomérica (EF) a distintas profundidades a lo largo del experimento (Figura 4.31). Para cada uno de los enantiómeros por separado, se ajustaron los datos de concentraciones obtenidos a la profundidad de 0-5 cm a una cinética de primer orden y se calcularon los parámetros cinéticos (Tabla 4.23).

El comportamiento del metalaxil fue enantioselectivo y dependiente de la profundidad y del tratamiento del suelo. Se observó que el valor de EF de los residuos de metalaxil fue de 0.5 sólo a tiempo 0, lo cual reflejó que la disolución de fungicida añadida era racémica. A medida que transcurrió el tiempo de experimento, el valor de EF fue aumentando tanto en el suelo sin tratar como en el suelo tratado con la organo-hidrotalcita, es decir, a medida que fue aumentando el tiempo del

experimento los residuos de metalaxil presentes en el suelo se enriquecieron en el enantiómero *S* (Figura 4.31). Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en el experimento de incubación de metalaxil en condiciones de laboratorio, en los que se observaba una degradación más rápida del enantiómero *R* frente al *S* y se atribuyó a un predominio de microorganismos degradadores o enzimas extracelulares que degradaban el *R*-metalaxil preferentemente. Estos resultados se confirman con los valores superiores de DT_{50} obtenidos para el *S*-metalaxil en ambos tratamientos bajo condiciones de campo (Tabla 4.23).

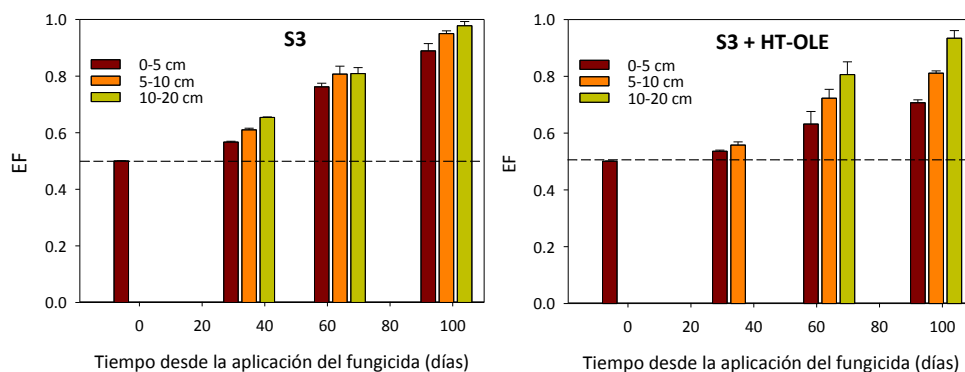


Figura 4.31. Variación de la fracción enantiomérica del metalaxil a diferentes profundidades para el suelo sin enmendar y enmendado con HT-OLE con el tiempo desde la aplicación del fungicida.

Si se comparan los valores de DT_{50} para el suelo sin enmendar y el suelo tratado con HT-OLE, se aprecia que la enmienda con la organo-hidrotalcita aumentó la persistencia de ambos enantiómeros en el suelo en la sección de 0-5 cm (Tabla 4.23). Los valores de tiempo de vida media fueron inferiores a los obtenidos en el experimento de laboratorio para el suelo S2, similar al S3 (Tabla 4.16). Esta diferencia puede ser debida, en parte, a que en las parcelas se producen pérdidas del fungicida por transporte, tanto de lixiviación como de escorrentía, que no tienen lugar en las condiciones controladas de las incubaciones. Los valores de EF fueron más altos en el suelo sin enmendar que en el suelo enmendado con HT-OLE (Figura 4.31). Al final del periodo del experimento (día 98) se observa que el valor de EF fue mucho mayor en el suelo sin enmendar que en el enmendado para las tres profundidades, pero sobre todo para la toma más superficial (0-5 cm). Este hecho pudo deberse a que la mayor adsorción del metalaxil en los 0-5 primeros cm del suelo enmendado protegió al

fungicida de ser degradado enantioselectivamente. Otros hechos que confirmaron esta hipótesis fueron la mayor enantioselectividad registrada en las muestras de suelo tomadas a la profundidad de 0-5 cm respecto a aquella en las alícuotas de suelo ricas en partículas de adsorbente tomadas de la misma profundidad (Tabla 4.22), así como el hecho de que, en las parcelas tratadas con HT-OLE, a medida que se analizó la disipación a profundidades mayores, donde hay menos organo-hidrotalcita, los valores de EF fueron mayores.

4.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio enantioselectivo del comportamiento del fungicida metalaxil

La adsorción del metalaxil en los dos suelos agrícolas seleccionados para los estudios de laboratorio de este trabajo (S1 y S2) no fue enantioselectiva, observándose una mayor adsorción de los dos enantiómeros del metalaxil en el suelo S1 (arcilloso) que en el suelo S2 (franco-arenoso), por el importante papel que juega la fracción arcilla en la adsorción de este fungicida. Sin embargo, la disipación del metalaxil en los suelos sí fue enantioselectiva, con una degradación más rápida del enantiómero biológicamente activo (*R*-metalaxil) frente al inactivo (*S*-metalaxil) y siendo ambos enantiómeros más persistentes en el suelo S1 que en el S2. La mayor adsorción y persistencia de los enantiómeros del metalaxil en el suelo S1 supuso que su lixiviación fuera más lenta y menos enantioselectiva en este suelo que en el suelo S2.

El efecto de la adición de los residuos orgánicos (ALP y ALPc) en el comportamiento de los enantiómeros del metalaxil fue diferente dependiendo del suelo y de la enmienda. A pesar de que no se observaron diferencias importantes en la adsorción de los enantiómeros del metalaxil en ambos suelos al aplicar los residuos, sí se detectaron diferencias en la persistencia. Así, en el suelo S1 la adición de los residuos de almazara supuso un aumento en la velocidad de degradación de los dos enantiómeros, mientras que en el suelo S2 la adición de ALP supuso una disminución en la velocidad de degradación del enantiómero *R* y un aumento en el enantiómero *S*. Por otro lado, el tratamiento del suelo S2 con ALPc significó una disminución en la persistencia de ambos enantiómeros. Respecto a la lixiviación, el tratamiento del suelo S1 con ALP y ALPc supuso un ligero aumento en la velocidad de lixiviación de ambos enantiómeros por competencia entre la materia orgánica proporcionada por

las enmiendas y el fungicida. En el caso del suelo S2, no se observaron diferencias importantes en la velocidad de lixiviación entre el suelo sin enmendar y el suelo enmendado con los residuos de almazara.

El resultado de la aplicación de organo-hidrotalcita (HT-ELA) a ambos suelos fue idéntico: un gran aumento de la adsorción de los dos enantiómeros del metalaxil, lo que dio lugar a un aumento de la persistencia y un retraso de la lixiviación de los mismos. Estos resultados indican que HT-ELA es una enmienda óptima para retener los enantiómeros del metalaxil en el suelo y mitigar los problemas asociados a su alto potencial de lixiviación, sobre todo del enantiómero más persistente (enantiómero inactivo, *S*-metalaxil). Esta suposición quedó confirmada con el experimento de campo, en el que la adición de una hidrotalcita modificada con el anión oleato (HT-OLE) dio como resultado un aumento de la adsorción de los enantiómeros del metalaxil en la zona más superficial del suelo, reduciendo la velocidad de los procesos de degradación y lixiviación de dichos enantiómeros respecto al suelo sin tratar, afectando además a la composición enantiomérica de los residuos del fungicida en el suelo.

4.2. ESTUDIO ENANTIOSELECTIVO DEL COMPORTAMIENTO DEL HERBICIDA IMAZAQUÍN

A continuación, se presentan y discuten los resultados del estudio enantioselectivo del comportamiento del herbicida imazaquín en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con residuos de almazara (ALP, ALPc y BC) y con una arcilla seleccionada entre HT-CO₃, HT₅₀₀, HT-ELA y SA-HDTMA. Se llevaron a cabo experimentos de adsorción, persistencia y lixiviación, en condiciones de laboratorio, y también bioensayos para evaluar la eficacia biológica de los enantiómeros del herbicida bajo diferentes condiciones de aplicación.

4.3.1. Estudios de adsorción-desorción

En un primer paso, se seleccionaron los adsorbentes con mejores propiedades de adsorción, así como el porcentaje óptimo de enmienda en el caso de la arcilla seleccionada. Para ello, se realizaron estudios de adsorción a una única concentración de imazaquín racémico (*rac*-imazaquín) de 1 mg/l. Seguidamente, se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción a los adsorbentes seleccionados y a los suelos enmendados con dichos adsorbentes en un rango de concentraciones de 0.5-5 mg/l de *rac*-imazaquín.

4.3.1.1. Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes

a) Adsorción a concentración única

El estudio de adsorción a concentración única reveló que ninguno de los residuos orgánicos (ALP, ALPc, BC) mostró afinidad por los enantiómeros del herbicida imazaquín, siendo su adsorción prácticamente nula. En el caso de las arcillas, las muestras HT-CO₃ y HT-ELA tampoco adsorbieron imazaquín. Esto se atribuyó a la elevada afinidad que presenta el anión carbonato por la interlámina, en el caso de HT-CO₃, que dificulta su desplazamiento por parte del herbicida, y a la repulsión electrostática entre el herbicida en su forma aniónica y la carga negativa de los aniones elaidato, en el caso de la muestra HT-ELA (Celis et al., 1999a; 2014). Por el contrario, el porcentaje de adsorción de los dos enantiómeros del imazaquín sobre la hidrotalcita calcinada (HT₅₀₀) fue del 100% (Tabla 4.24). Esta elevada capacidad

adsorbente de la muestra HT₅₀₀ se ha observado previamente para otros plaguicidas aniónicos, siendo la reconstrucción de la estructura tipo hidrotalcita, con incorporación del plaguicida en el espacio interlamilar, el mecanismo de adsorción que se ha planteado (Sato et al., 1986; Sato & Okuwaki et al., 1991; Hermosín et al., 1996; Celis et al., 1999a; Pavlovic et al., 2005; Cardoso & Valim, 2006). A pesar de las excelentes propiedades adsorbentes de la muestra HT₅₀₀, estudios posteriores realizados en este trabajo demostraron que el imazaquín se degradaba rápidamente tras ser adsorbido en dicha hidrotalcita. Por ello, aun siendo un buen adsorbente con fines descontaminantes, se ensayó otro material arcilloso con el fin único de inmovilizar el herbicida en el suelo sin degradarlo. Así, se probó con la montmorillonita modificada con el catión orgánico hexadeciltrimetilamonio (SA-HDTMA), sobre la base de estudios anteriores en los que se había observado una gran afinidad entre esta organo-arcilla y herbicidas aniónicos del grupo de las imidazolinonas (Celis et al., 1999a; Park et al., 2014). Los porcentajes de adsorción en torno al 96% para ambos enantiómeros del imazaquín en SA-HDTMA (Tabla 4.24) confirmaron la elevada afinidad por los mismos de la organo-arcilla seleccionada.

Tabla 4.24. Valores de K_d y % adsorbido para los enantiómeros del imazaquín en HT₅₀₀ y SA-HDTMA a partir de una disolución de *rac*-imazaquín de 1 mg/l.

		% Adsorbido	K_d (l/kg)	EF
HT₅₀₀	<i>S</i> -imazaquín	100.0 ± 0.0	-	-
	<i>R</i> -imazaquín	100.0 ± 0.0	-	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	100.0 ± 0.0	-	
SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	95.6 ± 0.2	9164 ± 586	0.51 ± 0.01
	<i>R</i> -imazaquín	95.9 ± 0.2	9504 ± 384	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	95.9 ± 0.2	9322 ± 459	

b) Isotermas de adsorción-desorción

Se obtuvieron las isotermas de adsorción-desorción del imazaquín a la muestra SA-HDTMA, al ser ésta el adsorbente que presentó las propiedades más óptimas de adsorción y estabilidad del herbicida entre todos los estudiados. Dichas isotermas se han representado en la Figura 4.32.

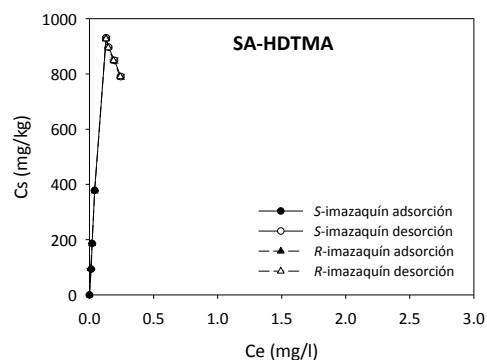


Figura 4.32. Isoterma de adsorción-desorción de S- y R-imazaquín en la muestra SA-HDTMA.

Los datos experimentales, tanto de la isoterma de adsorción como de desorción, se ajustaron a la ecuación de Freundlich y los parámetros determinados se resumen en la Tabla 4.25.

Tabla 4.25. Coeficientes de Freundlich para la adsorción y desorción de S-, R- y (S+R)-imazaquín en SA-HDTMA.

		S-imazaquín	R-imazaquín	(S+R)-imazaquín
ADSORCIÓN	K_f	7520 (5199-10877) ^a	6166 (5026-6263)	6956 (5796-8350)
	N_f	0.97 ± 0.16	0.86 ± 0.03	0.92 ± 0.06
	R^2	0.976	0.996	0.990
DESORCIÓN	K_{f-des}	558 (542-575)	554 (543-566)	1847 (1846-1847)
	N_{f-des}	-0.25 ± 0.01	-0.25 ± 0.01	-0.04 ± 0.00
	R^2	0.991	0.995	0.995
TII		1.26	1.29	1.01

^arango de error estándar

La Figura 4.32 muestra una completa coincidencia entre las isotermas de los dos enantiómeros, tanto durante la adsorción como durante la desorción, lo cual es indicativa el carácter no enantioselectivo de la adsorción del herbicida en la organo-arcilla. Los valores de K_f (Tabla 4.25) reflejaron la alta adsorción de ambos

enantiómeros sobre SA-HDTMA. Esta gran adsorción se atribuye a la estructura parafínica generada por la incorporación del anión HDTMA en el espacio interlamina de la arcilla (SAz-1). Dicha estructura presenta una amplia interlamina que muestra una alta afinidad por compuestos neutros e incluso aniónicos, como es el imazaquín, lo cual puede atribuirse a interacciones hidrofóbicas entre las cadenas carbonadas del catión HDTMA y el grupo quinolina presente en el herbicida. Otro mecanismo que puede contribuir en la adsorción del imazaquín a la organo-arcilla fue propuesto por Park et al. (2014), según el cual podría darse interacción electrostática entre el imazaquín en su forma aniónica y los cationes orgánicos presentes en las superficies externas de la organo-arcilla. Por lo tanto, se puede considerar que la alta afinidad entre la SA-HDTMA y el imazaquín podría ser consecuencia de interacciones tanto hidrofóbicas como electrostáticas.

Tanto la Figura 4.32 como los valores de $TII > 1$ obtenidos (Tabla 4.25) indican que la histéresis del proceso de adsorción del imazaquín en SA-HDTMA es negativa. Este fenómeno es común en los casos en los que la arcilla tiene una alta afinidad por el plaguicida, de modo que la cantidad de compuesto desorbido puede ser mayor al predicho a partir de la isoterma debido a diferentes artefactos experimentales (Barriuso et al., 1994).

4.3.1.2. Estudios de adsorción-desorción a suelos sin enmendar y enmendados con SA-HDTMA

a) Estudio preliminar: Adsorción a concentración única

Para evaluar la adsorción de los enantiómeros de imazaquín en los suelos sin enmendar y determinar su evolución con el porcentaje de organo-arcilla SA-HDTMA añadida, se realizaron adsorciones a concentración única de 1 mg/l de *rac*-imazaquín. Conjuntamente, se midió el pH en cada una de las suspensiones debido a su importancia en la adsorción del imazaquín.

Tabla 4.26. Porcentaje de adsorción y coeficiente de distribución para *S*-, *R*- y (*S+R*)-imazaquín en los suelos sin enmendar y enmendados con SA-HDTMA a una concentración inicial de *rac*-imazaquín de 1 mg/l.

		% Adsorbido	K_d (l/kg)	pH
S1	<i>S</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	8.4
	<i>R</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	< 1%	< 0.1	
S1 + 1% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	8.2
	<i>R</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	< 1%	< 0.1	
S1 + 2% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	8.2
	<i>R</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	< 1%	< 0.1	
S1 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	3.6 ± 0.4	0.3 ± 0.0	8.3
	<i>R</i> -imazaquín	3.9 ± 0.7	0.4 ± 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	3.8 ± 0.4	0.3 ± 0.0	
S2	<i>S</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	8.1
	<i>R</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	< 1%	< 0.1	
S2 + 1% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	8.1
	<i>R</i> -imazaquín	< 1%	< 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	< 1%	< 0.1	
S2 + 2% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	1.5 ± 0.2	0.1 ± 0.0	8.1
	<i>R</i> -imazaquín	2.1 ± 0.4	0.2 ± 0.0	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	1.8 ± 0.3	0.1 ± 0.0	
S2 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	10.3 ± 0.4	0.9 ± 0.0	8.1
	<i>R</i> -imazaquín	9.6 ± 0.8	0.8 ± 0.1	
	(<i>S+R</i>)-imazaquín	10.0 ± 0.6	0.8 ± 0.1	

Los datos de la Tabla 4.26 muestran que los suelos sin enmendar no adsorben imazaquín. Este hecho puede atribuirse a la presencia del herbicida en su forma aniónica al pH de los suelos ($\text{pH} > 8$), de modo que la carga negativa del herbicida es repelida por los coloides del suelo, los cuales están también cargados negativamente a este pH alcalino. Otras propiedades que pudieron contribuir a la baja adsorción del imazaquín en los suelos fueron los bajos contenidos en materia orgánica y óxidos de hierro encontrados en los mismos (Regitano et al, 1997; Rocha et al., 2002). Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos en los que también se detectó una baja adsorción del herbicida en suelos con pH alcalino y con contenidos de carbono

orgánico similares a los de nuestros suelos (Gennari et al., 1998; Aichele & Penner, 2005).

Los resultados recogidos en la Tabla 4.26 ponen de manifiesto que, a pesar de la elevada capacidad de adsorción de la organoarcilla para el herbicida, la adición de la misma a porcentajes del 1% y del 2% no fue suficiente para detectar adsorción de los enantiómeros del imazaquín en los suelos. Al enmendar los suelos con un porcentaje del 5% de SA-HDTMA sí se observó un aumento en la adsorción respecto a los suelos sin enmendar, aunque esta adsorción fue menor a la esperada teniendo en cuenta la alta afinidad entre el herbicida y la organo-arcilla (Tabla 4.24). Esta reducción de la capacidad de adsorción de la SA-HDTMA al mezclarse con el suelo puede ser consecuencia de su interacción con ciertos componentes solubles del suelo, dando lugar a cierta competencia por los sitios de adsorción o a un bloqueo de la superficie, disminuyendo la adsorción del imazaquín en la organo-arcilla (Gámiz et al., 2010). Este efecto parece producirse con mayor intensidad en el suelo S1 (Tabla 4.26).

b) Isotermas de adsorción-desorción a los suelos enmendados con SA-HDTMA al 5%

En la Figura 4.33 están representadas las isotermas de adsorción-desorción de los enantiómeros de imazaquín en ambos suelos enmendados con SA-HDTMA al 5%.

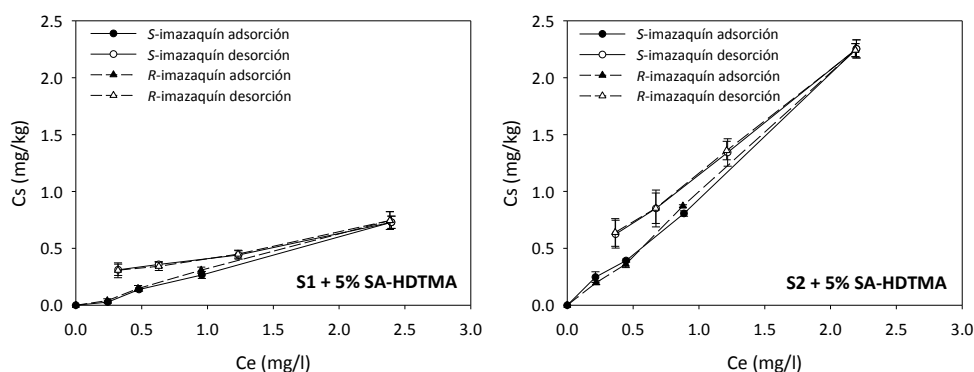


Figura 4.33. Isotermas de adsorción-desorción de *S*- y *R*-imazaquín en los suelos enmendados con SA-HDTMA al 5%.

Los datos de las isothermas de adsorción y desorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich, obteniéndose los parámetros que se resumen en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-imazaquín en los suelos enmendados con SA-HDTMA al 5%.

		K_f	N_f	R^2
S1 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -	0.26 (0.21-0.32)	1.37 ± 0.22	0.952
	<i>R</i> -	0.29 (0.25-0.34)	1.23 ± 0.15	0.970
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-	0.22 (0.19-0.26)	1.31 ± 0.49	0.961
S2 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -	0.97 (0.90-1.05)	0.96 ± 0.08	0.985
	<i>R</i> -	0.96 (0.91-1.01)	1.07 ± 0.05	0.995
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-	0.95 (0.90-1.00)	1.02 ± 0.06	0.993

Las isothermas de adsorción-desorción (Figura 4.33) muestran cómo la adsorción del imazaquín en ambos suelos enmendados con la organo-arcilla no fue enantioselectiva. El suelo S2 presentó una mayor adsorción de los enantiómeros *R* y *S* ($K_f = 0.96$ - 0.97) al compararlo con el suelo S1 ($K_f = 0.26$ - 0.29) debido, probablemente, a su menor contenido en arcillas y/o a un menor efecto de sus componentes a la hora de reducir la capacidad adsorbente de la organoarcilla. Así, la mayor cantidad de arcillas presente en el suelo S1 podría intensificar la repulsión electrostática entre los enantiómeros del imazaquín, cargados negativamente, y las partículas del suelo o, como se mencionó anteriormente, los componentes solubles del suelo S1 podrían bloquear los sitios de adsorción del imazaquín presentes en SA-HDTMA en mayor medida que los componentes solubles del S2.

A partir del ajuste de los datos de desorción a la ecuación de Freundlich se calculó el valor del índice termodinámico de irreversibilidad (TII). Los parámetros del ajuste junto con los valores de los índices TII se resumen en la Tabla 4.28. Los valores de (TII) indican que la adsorción del imazaquín en el suelo S1 enmendado con la organo-arcilla fue más irreversible que en el caso del suelo S2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.28. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-imazaquín en los suelos enmendados con SA-HDTMA.

		K_{f-des}	N_{f-des}	R^2	TII
S1 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -	0.46 (0.43-0.49)	0.41 ± 0.08	0.941	0.70
	<i>R</i> -	0.46 (0.43-0.49)	0.43 ± 0.09	0.911	0.65
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-	0.68 (0.63-0.74)	0.42 ± 0.09	0.914	0.68
S1 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -	1.21 (1.16-1.26)	0.72 ± 0.06	0.986	0.25
	<i>R</i> -	1.22 (1.18-1.28)	0.71 ± 0.06	0.984	0.34
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-	1.45 (1.41-1.57)	0.71 ± 0.06	0.985	0.30

4.3.2. Estudios de persistencia

Se evaluó la persistencia de los enantiómeros del imazaquín en los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con los residuos de almazara (ALP, ALPc y BC) y con la organo-arcilla seleccionada (SA-HDTMA). En el caso de los suelos sin enmendar, el herbicida se adicionó en forma de mezcla racémica (*rac*-imazaquín) y como enantiómeros puros (*S*-imazaquín y *R*-imazaquín). Asimismo, se estudió el efecto de la aplicación sucesiva de imazaquín racémico en el suelo S2.

La degradación del imazaquín en suelos se debe principalmente a procesos de fotodegradación y de biodegradación (Wang et al., 2008). También es posible que el imazaquín experimente hidrólisis, aunque a pH < 9 este proceso es muy lento si se compara con los otros dos anteriormente mencionados (Barkani et al., 2005; Ramezani et al., 2008). Para evitar la fotodegradación del herbicida durante el experimento de persistencia, las incubaciones se llevaron a cabo en oscuridad. De este modo, se asumió que la degradación de los enantiómeros del imazaquín en los experimentos realizados fue principalmente microbiológica.

4.3.2.1. Persistencia en los suelos sin enmendar

En la Figura 4.34 se han representado las curvas de disipación para el S- y el R-imazaquín en los suelos S1 y S2, tras aplicar el herbicida en forma racémica o como enantiómeros puros.

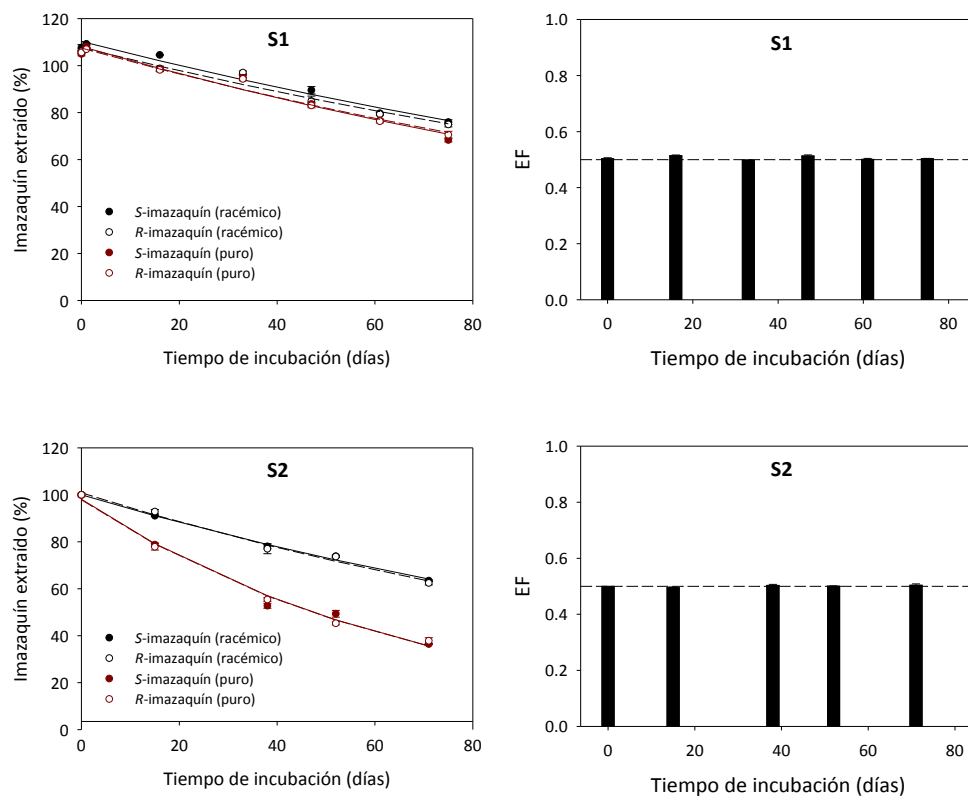


Figura 4.34. Curvas de disipación de imazaquín en los suelos tras aplicar el herbicida en forma racémica (*rac*-imazaquín) y como enantiómeros puros (S- y R-imazaquín). Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden (izquierda). Cambios en la fracción enantiomérica (EF) con el tiempo de incubación para el herbicida añadido en forma racémica (derecha).

Se observó que la degradación del herbicida en ambos suelos no fue enantioselectiva, es decir, que los enantiómeros se degradaron a la misma velocidad. Esta ausencia de enantioselectividad en el proceso de degradación fue previamente observada por Jarman et al. (2005), quienes sugirieron la presencia de una población microbiana en el suelo que degradaba por igual ambos enantiómeros. Sin embargo,

Ramezani et al. (2010) encontraron cierta enantioselectividad en la degradación de este herbicida en varios suelos procedentes de Australia. Así, el *R*-imazaquín (enantiómero activo) se degradaba a mayor velocidad que el *S*-imazaquín (enantiómero inactivo). No obstante, hay que tener en cuenta que este comportamiento fue detectado principalmente a tiempos de incubación más largos y para suelos en los que la degradación de los enantiómeros del imazaquín fue más rápida que en nuestro estudio.

En ambos suelos la degradación de los enantiómeros del imazaquín resultó muy lenta (Figura 4.34). Este comportamiento fue observado previamente en varios estudios de degradación de imazaquín en los que se consideró al plaguicida como un compuesto aquiral (Basham & Lavy, 1987; Cantwell et al., 1989; Loux et al., 1989a). El herbicida se degradó más lentamente en el suelo S1 que en el suelo S2 (Tabla 4.29 y 4.30). Puesto que la principal causa de degradación del imazaquín en suelos es microbiológica, y dado que no se observó una adsorción apreciable del herbicida en ninguno de los suelos (Tabla 4.26), probablemente las diferencias en las velocidades de degradación fueron consecuencia de la distinta población microbiana de los suelos considerados.

Cuando los enantiómeros se aplicaron a los suelos en forma pura, se degradaron a mayor velocidad que cuando se adicionaron en forma de mezcla racémica. Este efecto se observó en ambos suelos, sin embargo en el caso del suelo franco-arenoso (S2) el efecto fue más pronunciado, ya que los enantiómeros puros presentaron un tiempo de vida media de 48 días frente a los valores de 105-110 días calculados para los enantiómeros aplicados como mezcla racémica (Tablas 4.29 y 4.30). Una posible explicación de este comportamiento es que los microorganismos presentes en el suelo degradaran de forma casi idéntica a ambos enantiómeros. De este modo, cuando sólo se aplica uno de los dos enantiómeros, toda la población microbiana con capacidad para degradar el imazaquín actuaría sobre las moléculas de dicho enantiómero, degradándose éste a mayor velocidad.

Un resultado muy relevante obtenido en las incubaciones de los suelos con los enantiómeros puros es que no se observó interconversión de *R*- a *S*-imazaquín ni viceversa. Esto nos indica que los enantiómeros puros son configuracionalmente estables en los suelos y, por tanto, la utilización del enantiómero activo puro (*R*-imazaquín) en lugar de la mezcla racémica sería viable.

Tabla 4.29. Constantes del ajuste de los datos de disipación de imazaquín a una cinética de primer orden en suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc, BC y SA-HDTMA.

Tratamiento		k (días ⁻¹)	t _{1/2} (días)	R ²
S1 (S-imazaquín)	S-imazaquín	0.0057 ± 0.0005 ^a	122	0.970
S1 (R-imazaquín)	R-imazaquín	0.0054 ± 0.0003	128	0.981
S1 (Rac-imazaquín)	S-imazaquín	0.0049 ± 0.0003	141	0.976
	R-imazaquín	0.0048 ± 0.0004	144	0.971
	(S+R)-imazaquín	0.0048 ± 0.0003	144	0.980
S1 + 2% ALP	S-imazaquín	0.0204 ± 0.0012	34	0.983
	R-imazaquín	0.0208 ± 0.0010	33	0.983
	(S+R)-imazaquín	0.0206 ± 0.0011	34	0.988
S1 + 2% ALPc	S-imazaquín	0.0061 ± 0.0007	114	0.939
	R-imazaquín	0.0059 ± 0.0005	117	0.967
	(S+R)-imazaquín	0.0060 ± 0.0006	116	0.955
S1 + 2% BC	S-imazaquín	0.0071 ± 0.0006	98	0.966
	R-imazaquín	0.0071 ± 0.0005	98	0.973
	(S+R)-imazaquín	0.0071 ± 0.0006	98	0.971
S1 + 1% SA-HDTMA	S-imazaquín	0.0055 ± 0.0006	126	0.952
	R-imazaquín	0.0051 ± 0.0006	136	0.931
	(S+R)-imazaquín	0.0053 ± 0.0006	131	0.945
S1 + 5% SA-HDTMA	S-imazaquín	0.0030 ± 0.0003	231	0.947
	R-imazaquín	0.0037 ± 0.0005	187	0.931
	(S+R)-imazaquín	0.0033 ± 0.0004	210	0.943

^aValor ± error estándar

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.30. Constantes del ajuste de los datos de disipación de imazaquín a una cinética de primer orden en suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc, BC y SA-HDTMA.

Tratamiento		k (días ⁻¹)	t _{1/2} (días)	R ²
S2 (S-imazaquín)	S-imazaquín	0.0143 ± 0.0010 ^a	48	0.985
S2 (R-imazaquín)	R-imazaquín	0.0143 ± 0.0007	48	0.992
S2 (Rac-imazaquín)	S-imazaquín	0.0063 ± 0.0003	110	0.995
	R-imazaquín	0.0066 ± 0.0004	105	0.989
	(S+R)-imazaquín	0.0064 ± 0.0003	108	0.993
S2 + 2% ALP	S-imazaquín	0.0074 ± 0.0005	94	0.986
	R-imazaquín	0.0079 ± 0.0002	88	0.998
	(S+R)-imazaquín	0.0077 ± 0.0002	90	0.997
S2 + 2% ALPc	S-imazaquín	0.0080 ± 0.0003	87	0.995
	R-imazaquín	0.0080 ± 0.0005	87	0.988
	(S+R)-imazaquín	0.0080 ± 0.0004	87	0.992
S2 + 2% BC	S-imazaquín	0.0085 ± 0.0006	82	0.985
	R-imazaquín	0.0085 ± 0.0007	82	0.982
	(S+R)-imazaquín	0.0085 ± 0.0006	82	0.985
S2 + 1% SA-HDTMA	S-imazaquín	0.0078 ± 0.0004	89	0.993
	R-imazaquín	0.0080 ± 0.0120	87	0.939
	(S+R)-imazaquín	0.0079 ± 0.0070	88	0.974
S2 + 5% SA-HDTMA	S-imazaquín	0.0027 ± 0.0003	257	0.953
	R-imazaquín	0.0022 ± 0.0004	315	0.861
	(S+R)-imazaquín	0.0024 ± 0.0004	289	0.885

^aValor ± error estándar

En las Tablas 4.31 y 4.32 se han resumido los valores de K_d obtenidos a partir del análisis de alícuotas de disolución de suelo extraídas con tubos Pall a diferentes tiempo de incubación ($t_0= 0$, $t_1= 33$ y $t_2= 75$ días para el suelo S1 y $t_0= 0$ y $t_1= 71$ días para el suelo S2). Los valores de K_d para los suelos a tiempo 0 fueron muy bajos (cerca de 0) para ambos suelos, lo cual confirma la escasa adsorción de los enantiómeros del imazaquín en los suelos S1 y S2. Al final del periodo de incubación, se observa un ligero aumento en el valor de la constante de distribución que puede atribuirse a un leve incremento en la adsorción con el tiempo por procesos de adsorción lenta (Cox et al., 1998; Celis & Koskinen, 1999; Cox et al., 1999).

Tabla 4.31. Constantes de distribución medidas durante el experimento de incubación para los enantiómeros del imazaquín en el suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc, BC y SA-HDTMA.

		t_0		t_1		t_2	
		K_d	EF	K_d	EF	K_d	EF
S1 (S-imazaquín)	S-	0.02 ± 0.00^a	-	0.09 ± 0.00	-	0.09 ± 0.00	-
S1 (R-imazaquín)	R-	0.01 ± 0.00	-	0.07 ± 0.00	-	0.10 ± 0.00	-
S1 (rac-imazaquín)	S-	0.02 ± 0.00		0.09 ± 0.00		0.09 ± 0.00	
	R-	0.01 ± 0.00	0.57	0.10 ± 0.00	0.48	0.08 ± 0.00	0.51
	(S+R)-	0.02 ± 0.00		0.09 ± 0.00		0.08 ± 0.00	
S1 + 2% ALP	S-	0.02 ± 0.01		0.03 ± 0.00		0.06 ± 0.02	
	R-	0.02 ± 0.01	0.49	0.05 ± 0.00	0.40	0.04 ± 0.02	0.64
	(S+R)-	0.02 ± 0.01		0.04 ± 0.00		0.05 ± 0.02	
S1 + 2% ALPc	S-	0.05 ± 0.01		0.13 ± 0.00		0.10 ± 0.01	
	R-	0.05 ± 0.01	0.54	0.12 ± 0.00	0.53	0.10 ± 0.01	0.52
	(S+R)-	0.05 ± 0.01		0.12 ± 0.00		0.10 ± 0.01	
S1 + 2% BC	S-	0.12 ± 0.00		0.58 ± 0.01		0.80 ± 0.01	
	R-	0.11 ± 0.00	0.54	0.56 ± 0.00	0.51	0.76 ± 0.01	0.52
	(S+R)-	0.12 ± 0.00		0.57 ± 0.00		0.79 ± 0.01	
S1 + 1% SA-HDTMA	S-	0.11 ± 0.00		0.11 ± 0.00		0.08 ± 0.00	
	R-	0.10 ± 0.00	0.52	0.12 ± 0.00	0.48	0.08 ± 0.00	0.52
	(S+R)-	0.11 ± 0.00		0.12 ± 0.00		0.08 ± 0.00	
S1 + 5% SA-HDTMA	S-	1.48 ± 0.01		0.99 ± 0.02		0.44 ± 0.00	
	R-	1.48 ± 0.02	0.50	0.95 ± 0.02	0.51	0.39 ± 0.00	0.54
	(S+R)-	1.48 ± 0.01		0.97 ± 0.02		0.41 ± 0.00	

^aValor \pm error estándar

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.32. Constantes de distribución medidas durante el experimento de incubación para los enantiómeros del imazaquín en el suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc, BC y SA-HDTMA.

		t_0		t_1	
		K_d	EF	K_d	EF
S2 (S-imazaquín)	S-	0.04 ± 0.00^a	-	0.02 ± 0.00	-
S2 (R-imazaquín)	R-	0.04 ± 0.00	-	0.04 ± 0.00	-
S2 (rac-imazaquín)	S-	0.03 ± 0.00	0.51	0.12 ± 0.00	0.48
	R-	0.04 ± 0.00		0.13 ± 0.00	
	(S+R)-	0.03 ± 0.00		0.12 ± 0.00	
S2 + 2% ALP	S-	0.23 ± 0.00	0.51	0.05 ± 0.00	0.44
	R-	0.25 ± 0.00		0.07 ± 0.00	
	(S+R)-	0.24 ± 0.00		0.06 ± 0.00	
S2 + 2% ALPc	S-	0.07 ± 0.00	0.52	0.10 ± 0.00	0.46
	R-	0.10 ± 0.01		0.12 ± 0.01	
	(S+R)-	0.08 ± 0.00		0.11 ± 0.00	
S2 + 2% BC	S-	0.20 ± 0.00	0.51	0.71 ± 0.01	0.48
	R-	0.22 ± 0.00		0.82 ± 0.02	
	(S+R)-	0.21 ± 0.00		0.77 ± 0.02	
S2 + 1% SA-HDTMA	S-	0.15 ± 0.00	0.51	0.14 ± 0.01	0.46
	R-	0.17 ± 0.00		0.17 ± 0.01	
	(S+R)-	0.16 ± 0.00		0.16 ± 0.01	
S2 + 5% SA-HDTMA	S-	2.78 ± 0.01	0.51	1.00 ± 0.02	0.50
	R-	2.77 ± 0.01		1.00 ± 0.02	
	(S+R)-	2.77 ± 0.00		1.00 ± 0.00	

^aValor \pm error estándar

4.3.2.2. Persistencia en los suelos enmendados con los residuos de almazara

A pesar de que las enmiendas orgánicas no aumentaron la adsorción del imazaquín en los suelos, se consideró la posibilidad de que la materia orgánica presente en ellas pudiera tener algún impacto en los microorganismos degradadores del herbicida. Por ello, se realizaron estudios de persistencia del imazaquín en los suelos enmendados al 2% con los residuos orgánicos, porcentaje equivalente a una dosis agronómica de unas 50 t/ha. Las curvas de disipación de los enantiómeros obtenidas para ambos suelos sin enmendar y enmendados con ALP, ALPc y BC se muestran en la Figura 4.35.

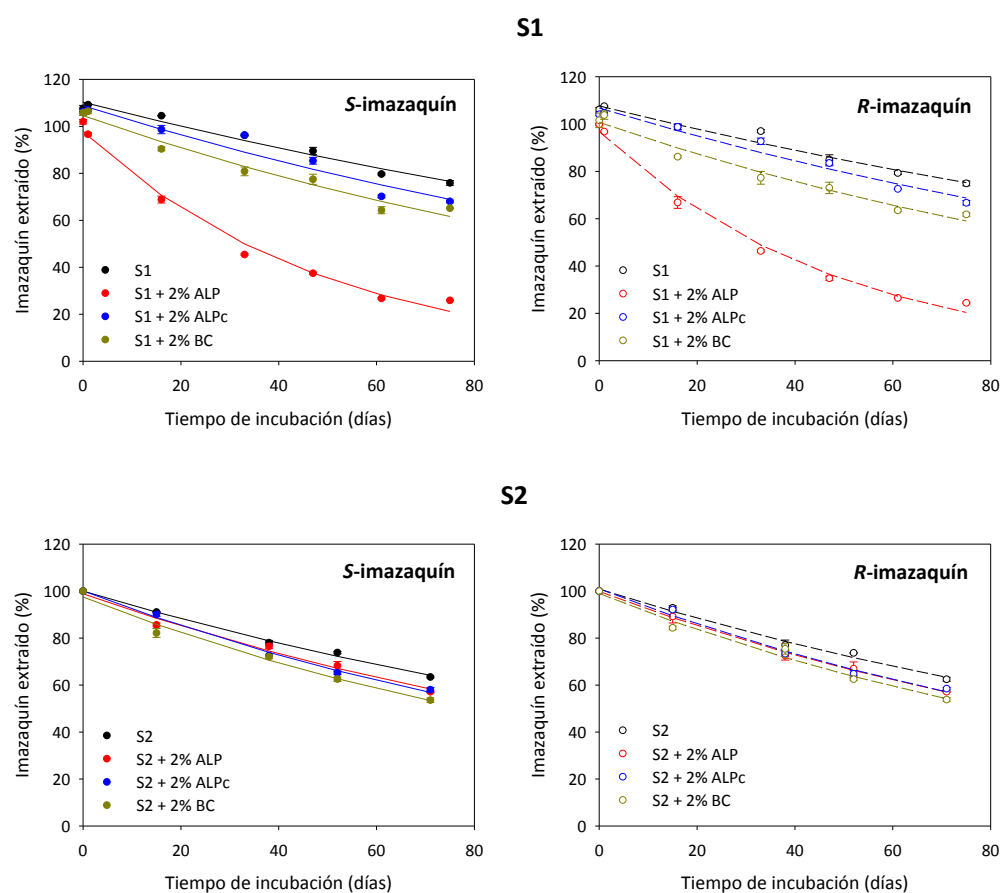


Figura 4.35. Curvas de disipación de los enantiómeros *S*- y *R*-imazaquín en los suelos sin enmendar y enmendados con ALP, ALPc y BC. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

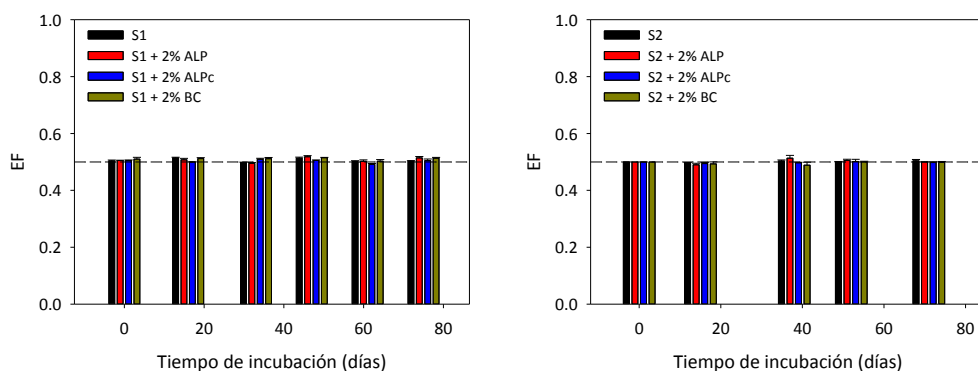


Figura 4.36. Representaciones de las variaciones de las fracciones enantioméricas (EF) con el tiempo de incubación del herbicida imazaquín añadido en forma racémica a los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con los residuos orgánicos (ALP, ALPc y BC).

La adición de las enmiendas orgánicas a los suelos no supuso cambios en el comportamiento no enantioselectivo de la disipación del imazaquín. Así, se observa en la Figura 4.36 que los valores de EF para ambos suelos tratados con los residuos orgánicos son aproximadamente constantes y cercanos a 0.5 durante todo el periodo de incubación. Sin embargo, sí se observaron cambios en la persistencia de los enantiómeros, produciéndose un aumento en la velocidad de degradación de los mismos tras aplicar las enmiendas. Este efecto puede deberse a la incorporación de microorganismos exógenos procedentes de los residuos de almazara que degradan al herbicida y/o fomentan la co-metabolización con los microbios autóctonos. Además, la materia orgánica suministrada por las enmiendas pudo servir como alimento de los microorganismos autóctonos estimulando así su crecimiento o modificar la proporción de determinadas poblaciones degradadoras (Barriuso et al., 1997; Ferreira et al., 2002; Wang et al., 2007b).

En el suelo S1, el tratamiento con alperujo fresco (ALP) dio como resultado un gran aumento en la velocidad de degradación de los enantiómeros del imazaquín en comparación con el suelo sin enmendar y enmendado con ALPc o BC. Este efecto puede atribuirse al alto contenido en arcillas de este suelo, ya que la materia orgánica proporcionada por la enmienda pudo ocupar sitios de adsorción lenta del imazaquín en el suelo (Tabla 4.30), dejando al herbicida más biodisponible para ser degradado. La enmienda con ALPc y BC también supuso una disminución en el tiempo de disipación del imazaquín, pero significativamente menor que en el caso del ALP. Esto

puede atribuirse al carácter de la materia orgánica soluble presente en los residuos. De este modo, el ALP presenta materia orgánica constituida por compuestos orgánicos sencillos, lábiles y poco humificados (Tabla 4.4) que se adsorben preferentemente a los componentes minerales de la fracción arcilla (Fernandes et al., 2006). Asimismo, este tipo de materia orgánica soluble puede ser utilizada por los microorganismos como alimento favoreciendo el crecimiento de sus colonias. Durante los tratamientos de preparación tanto de ALPc como de BC, se redujo considerablemente la cantidad de materia orgánica soluble lábil, aumentando los compuestos de mayor peso molecular, más complejos y humificados, los cuales se adsorben en menor medida en sitios de difícil acceso presentes en la fracción arcilla y son también menos adecuados para ser utilizados como sustento de los microorganismos. Por otra parte, se observa que en el suelo S1 enmendado con BC tanto el *S*- como el *R*-imazaquín se degradan ligeramente más rápido que en el suelo enmendado con ALPc, a pesar de que los procesos de adsorción lenta provocaron un aumento del valor de K_d en el suelo enmendado con BC que no se observó para el ALPc (Tabla 4.31). Este comportamiento ha sido anteriormente observado para otros plaguicidas aniónicos como el MCPA (Trigo et al., 2014) y podría estar relacionado con el hecho de que la adición de BC pueda afectar de forma selectiva el crecimiento de determinadas colonias degradadoras (Khodadad et al., 2011).

La aplicación de los residuos orgánicos al suelo S2 también supuso un aumento en la velocidad de degradación de *S*- y *R*-imazaquín. No obstante, el efecto de las enmiendas orgánicas resultó menos importante que el observado en el suelo S1 debido, probablemente, al menor contenido en arcillas del suelo franco-arenoso (S2) al compararlo con el suelo arcilloso (S1) y reflejando de esta forma la importancia que tiene el tipo de suelo al que se aplica una enmienda en el efecto que ésta puede producir en el comportamiento de los plaguicidas.

4.3.2.3. Persistencia en los suelos enmendados con organo-arcilla

Las curvas de disipación para los enantiómeros del imazaquín en los suelos enmendados con SA-HDTMA al 1 y 5% se han representado en la Figura 4.37.

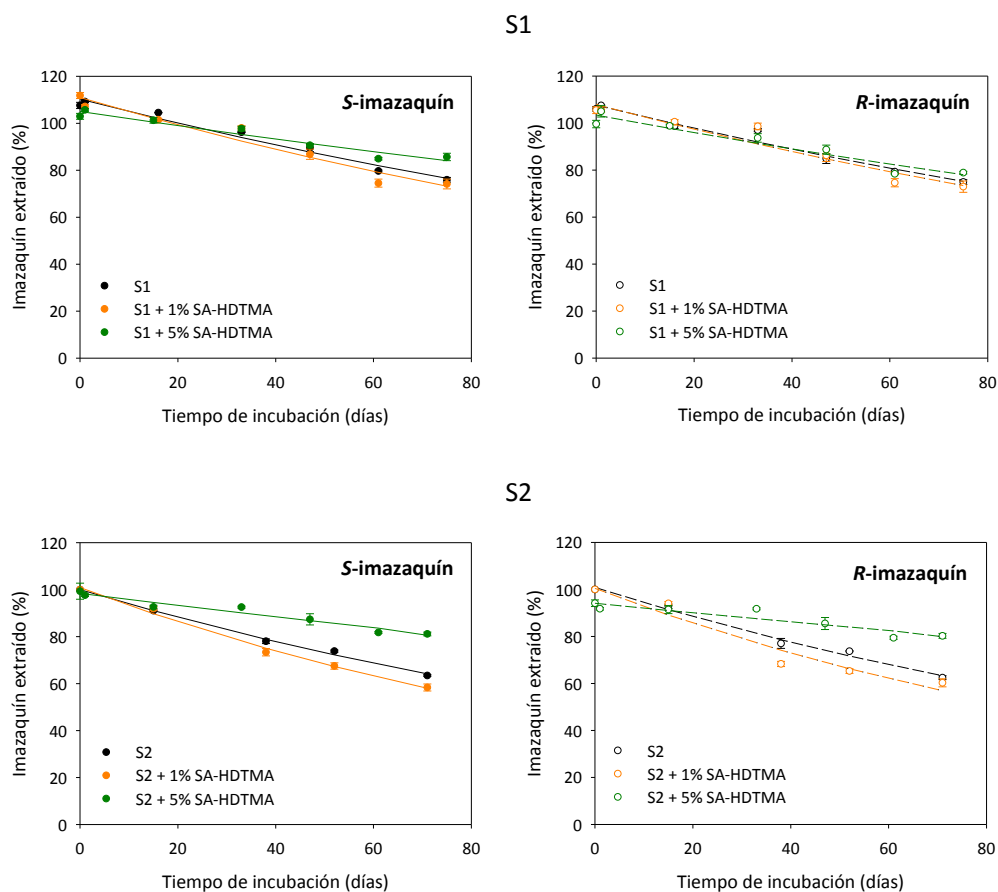


Figura 4.37. Curvas de disipación de los enantiómeros *S*- y *R*-imazaquín en los suelos sin enmendar y enmendados con SA-HDTMA. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

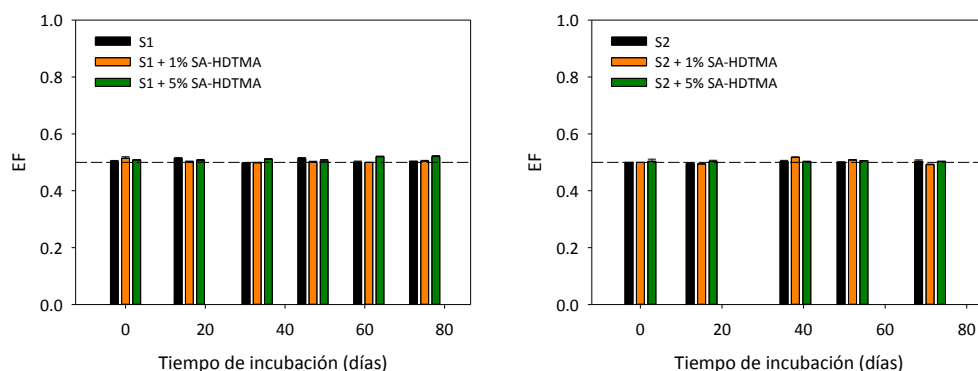


Figura 4.38. Representaciones de las variaciones de las fracciones enantioméricas (EF) con el tiempo de incubación del herbicida imazaquín añadido en forma racémica a los suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados con la organo-arcilla SA-HDTMA.

En vista de los resultados de degradación no enantioselectiva en los suelos sin enmendar, se preveía que la disipación de los enantiómeros del herbicida en los suelos enmendados con la organo-arcilla fuera igualmente no enantioselectiva. Este comportamiento se confirma con los valores de EF obtenidos, los cuales son próximos a 0.5 durante todo el tiempo de incubación (Figura 4.38)

La enmienda de los suelos con SA-HDTMA en un porcentaje del 5% supuso una notable disminución de la velocidad de degradación de los enantiómeros del imazaquín al compararlo con los suelos sin enmendar (Tabla 4.29 y 4.30). Este efecto se atribuye a la alta adsorción de los enantiómeros en los suelos enmendados con la organo-arcilla, ya que la adsorción pudo proteger al herbicida de la biodegradación. Además, no es esperable de que adición de SA-HDTMA proporcione ningún tipo de nutrientes o microorganismos exógenos al suelo que puedan acelerar la degradación. Por el contrario, los iones alquilamonio cuaternarios sí pueden presentar ciertas propiedades antimicrobianas que pueden dificultar la atenuación natural de los contaminantes en el medio ambiente, aumentando su persistencia (Nye et al., 1994; Sarkar et al., 2010). Al comparar el efecto de la organo-arcilla en ambos suelos se advierte que la degradación del imazaquín fue más lenta en el suelo S2 enmendado con SA-HDTMA, lo cual es consecuencia de la mayor adsorción que presenta el suelo S2 tratado con la organo-arcilla al compararlo con el suelo S1 (Tabla 4.27).

A diferencia del tratamiento con la organoarcilla a una dosis del 5%, el tratamiento con SA-HDTMA al 1% no fue suficiente para observar cambios en la disipación de los enantiómeros del imazaquín en ninguno de los suelos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos de adsorción, en los que la enmienda al 1% de ambos suelos no aumentó significativamente la adsorción de los enantiómeros en dichos suelos (Tabla 4.26).

Los valores de K_d obtenidos a partir del análisis de las concentraciones de los enantiómeros en disolución con los tubos Pall para ambos suelos enmendados con SA-HDTMA al 1 y 5% durante el experimento de incubación están incluidos en las Tablas 4.31 y 4.32. A un porcentaje de enmienda del 1%, se observaron valores de K_d ligeramente superiores a tiempo 0 al compararlos con los correspondientes suelos sin enmendar, lo cual sugiere una leve mayor adsorción de los enantiómeros del imazaquín. Estos valores de K_d permanecieron prácticamente constantes hasta el final del experimento de incubación. Por el contrario, en el caso de ambos suelos enmendados con SA-HDTMA al 5%, los valores de K_d fueron muy superiores a los calculados para los suelos sin enmendar y enmendados con los residuos orgánicos, debido a la alta adsorción del imazaquín en los suelos tratados con la organo-arcilla a este porcentaje. Al final del tiempo de incubación, los valores de K_d disminuyeron considerablemente para ambos suelos enmendados, lo cual supone una pérdida de capacidad adsorbente de la SA-HDTMA con el paso del tiempo, posiblemente debida a la presencia de componentes solubles del suelo que bloquean sitios de adsorción de la organo-arcilla o a una descomposición del complejo arcilla-catión orgánico a lo largo del tiempo (Gámiz et al., 2010). Un efecto similar se observó también en el experimento de adsorción, en el que la mezcla del adsorbente con los suelos redujo, en gran medida, la alta adsorción observada para SA-HDTMA pura (Tabla 4.26). Los valores de K_d fueron mayores para el suelo S2 enmendado con SA-HDTMA que para el suelo S1 tratado con la organo-arcilla, lo cual también concuerda con los resultados de los experimentos de adsorción discutidos en el apartado 4.3.1.2, en los que el suelo S1 enmendado al 5% con la organo-arcilla adsorbía imazaquín en mayor cantidad que el suelo S2 enmendado de la misma forma.

4.3.2.4. Estudio de la persistencia bajo aplicaciones sucesivas

En el suelo S2, se evaluó el efecto en la disipación de los enantiómeros del imazaquín de adiciones repetidas del herbicida. Para ello, tras finalizar el experimento de incubación con el suelo sin enmendar, se aplicó una segunda dosis de 2 mg/kg de imazaquín racémico y se siguió la disipación de los enantiómeros del herbicida. Las curvas de disipación para el S- y R-imazaquín para la 1ª y 2ª adición del herbicida se presentan en la Figura 4.39.

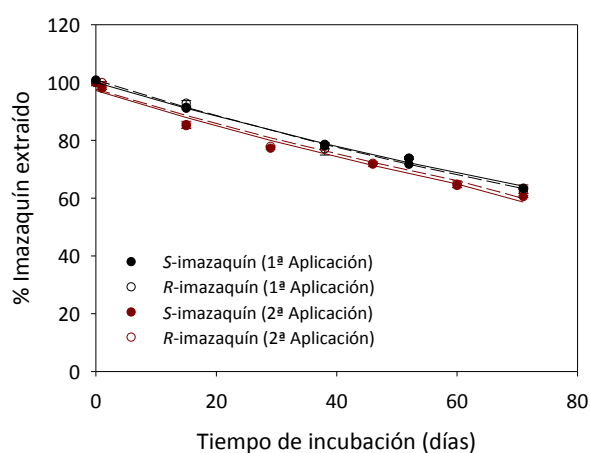


Figura 4.39. Curvas de disipación del S- y R-imazaquín tras dos aplicaciones sucesivas al suelo S2. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

Tras la aplicación de la segunda dosis de imazaquín, no se detectaron diferencias significativas en la velocidad de degradación de los enantiómeros al compararla con la velocidad observada en la primera aplicación (Tabla 4.33). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bundt et al. (2015) en un estudio de disipación no enantioselectivo de cinco imidazolinonas (imazetapir, imazapir, imazapic, imazametabenz e imazamox) en suelos con dos años de historia de aplicación. En dicho estudio se concluyó que la aplicación previa de imidazolinonas en el suelo no estimuló la degradación microbiológica de herbicidas del mismo grupo químico, llegando incluso a disminuir la actividad microbiana en algunos casos. Nuestro trabajo confirma este resultado y muestra además que este comportamiento es aplicable a ambos enantiómeros del imazaquín.

Tabla 4.33. Constantes del ajuste de los datos experimentales de disipación de rac-imazaquín en el suelo S2 a una cinética de primer orden bajo aplicaciones sucesivas.

		k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	R^2
1ª Aplicación	S-imazaquín	0.0063 ± 0.0003	110	0.995
	R- imazaquín	0.0066 ± 0.0004	105	0.989
	(S+R)-imazaquín	0.0064 ± 0.0003	108	0.993
2ª Aplicación	S-imazaquín	0.0056 ± 0.0002	124	0.995
	R-imazaquín	0.0054 ± 0.0002	128	0.990
	(S+R)-imazaquín	0.0055 ± 0.0002	126	0.994

4.3.3. Estudios de lixiviación

A continuación, se presentan los resultados del estudio enantioselectivo del proceso de lixiviación del imazaquín a través de columnas de suelo y el efecto de la enmienda con residuos de almazara y con organo-arcilla sobre dicho proceso. Los tratamientos aplicados fueron ALP, ALPc y BC en una proporción del 2% en toda la columna y SA-HDTMA en los 2.5 primeros cm de la columna en un porcentaje del 1 y del 5%. El herbicida se adicionó en forma de mezcla racémica en las columnas de suelos S1 y S2 sin enmendar y enmendados, así como en forma de enantiómeros puros exclusivamente en el caso de columnas de suelo sin tratar. Finalmente, se estudió las diferencias en la lixiviación del imazaquín en el suelo S2 al adicionar el herbicida en forma de mezcla racémica o en forma de enantiómero activo (*R*) puro, aplicando este último tanto en forma libre (en disolución) como en forma de complejo con la organo-arcilla SA-HDTMA.

4.3.3.1. Lixiviación en los suelos sin enmendar

El proceso de lixiviación del imazaquín en ambos suelos sin enmendar no fue enantioselectivo, es decir, los dos enantiómeros, añadidos en forma racémica, se movieron a través de la columna a la misma velocidad (Figura 4.40 y 4.41).

S1

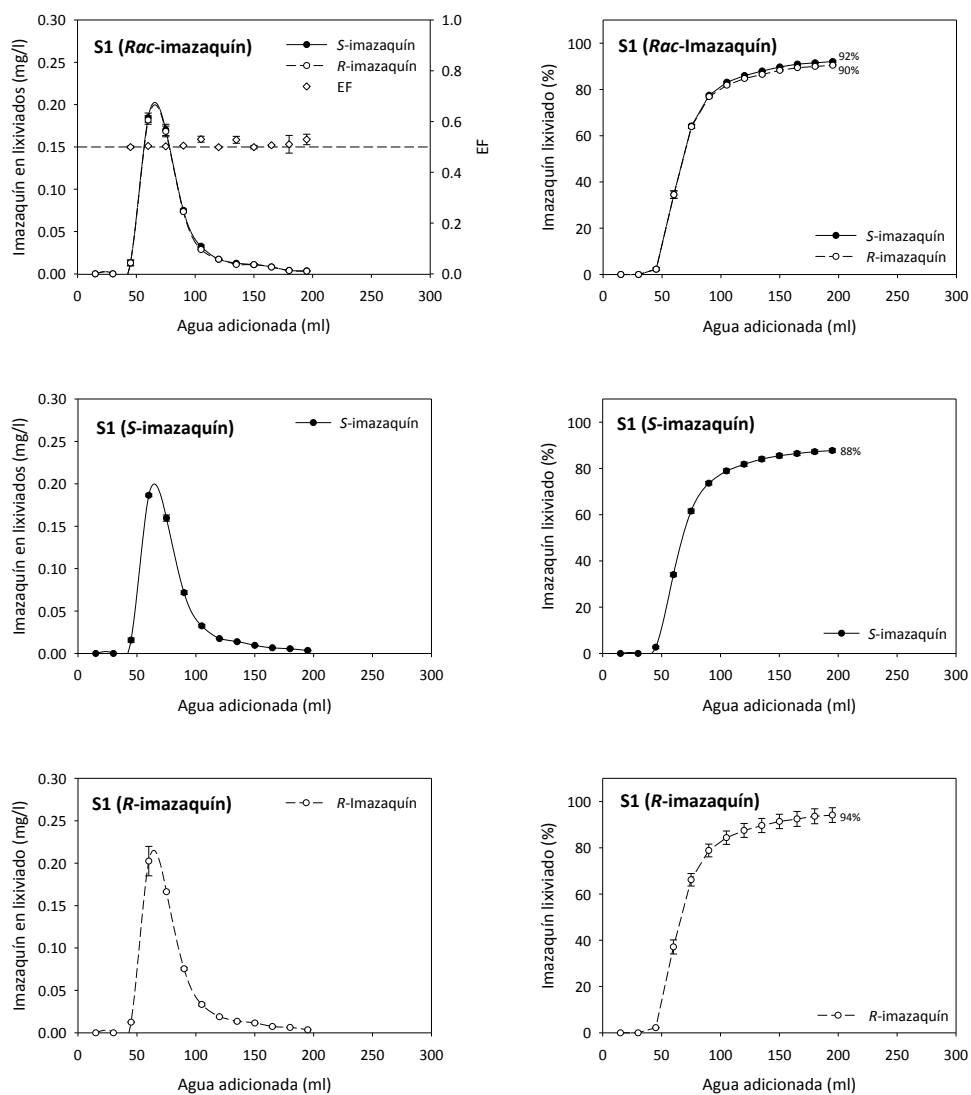


Figura 4.40. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica y como enantiómeros puros a columnas de suelo S1 sin enmendar. Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

S2

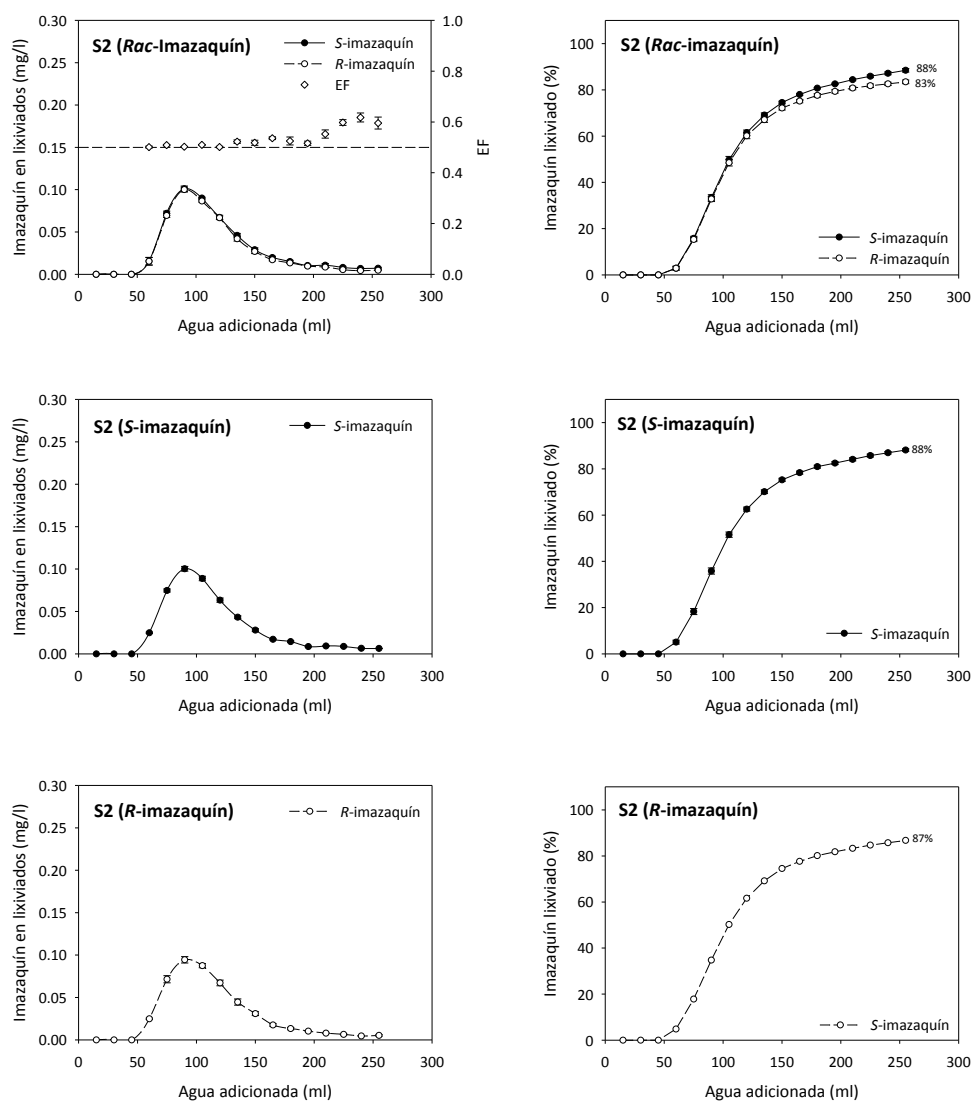


Figura 4.41. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica y como enantiómeros puros a columnas de suelo S2 sin enmendar. Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidos en las curvas relativas.

La lixiviación de los enantiómeros en las columnas de suelo S1 fue más rápida en comparación a las columnas de S2. Esto se ve reflejado en que en el suelo S1, la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) de *S*- y *R*-imazaquín en los lixiviados fue de 0.2 mg/l y apareció tras adicionar 65 ml de agua, mientras que en el caso del suelo S2, $C_{\text{máx}}$ fue de 0.10 mg/l para los dos enantiómeros y apareció tras adicionar un volumen de 90 ml de agua. La mayor velocidad de lixiviación de los enantiómeros en las columnas de suelo S1 podría haber sido consecuencia del mayor contenido en arcillas de este suelo, que pudo intensificar las repulsiones entre el imazaquín en su forma aniónica y las partículas de suelo. Para ambos suelos se observa que la mayor parte del imazaquín adicionado a las columnas se recuperó en los lixiviados (Figuras 4.40 y 4.41 y Tablas 4.34 y 4.35). El menor valor del porcentaje lixiviado en el caso del suelo S2 puede atribuirse a la menor persistencia de los enantiómeros en este suelo, tal como se observó en los experimentos de incubación (apartado 4.3.2.1).

El comportamiento de los enantiómeros del imazaquín cuando fueron adicionados como enantiómeros puros fue análogo al observado tras añadirlos como mezcla racémica. Cabe destacar que, a pesar de las diferencias en la velocidad de degradación de los enantiómeros observadas dependiendo de la forma de aplicación del herbicida, en la lixiviación no se detectó dicho efecto. Esto puede atribuirse a la alta velocidad de lixiviación y a la alta persistencia de imazaquín en los suelos, de modo que el tiempo de residencia de los enantiómeros del herbicida en la columna fue insuficiente para que se degradasen más rápidamente cuando se adicionaron como enantiómeros puros.

Tabla 4.34. Concentración máxima de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-imazaquín en los lixiviados ($C_{\text{máx}}$) y el volumen al que apareció dicha concentración máxima ($V_{\text{máx}}$), junto con el porcentaje total de los enantiómeros lixiviados en columnas de suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALPc, BC y SA-HDTMA.

Tratamientos		$C_{\text{máx}}$ (mg/l)	$V_{\text{máx}}$ (ml)	Lixiviado (%)
S1 (<i>S</i>-imazaquín)	<i>S</i> -imazaquín	0.20	65	88
S1 (<i>R</i>-imazaquín)	<i>R</i> -imazaquín	0.21	65	94
S1 (<i>Rac</i>-imazaquín)	<i>S</i> -imazaquín	0.20	65	92
	<i>R</i> -imazaquín	0.20	65	90
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.40	65	91
S1 + 2% ALPc	<i>S</i> -imazaquín	0.21	75	88
	<i>R</i> -imazaquín	0.21	75	87
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.43	75	88
S1 + 2% BC	<i>S</i> -imazaquín	0.10	75	75
	<i>R</i> -imazaquín	0.10	75	74
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.20	75	74
S1 + 1% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	0.20	65	98
	<i>R</i> -imazaquín	0.20	65	97
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.37	65	98
S1 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	0.11	115	87
	<i>R</i> -imazaquín	0.10	115	88
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.21	115	87

Tabla 4.35. Concentración máxima de *S*-, *R*- y (*S*+*R*)-imazaquín en los lixiviados ($C_{\text{máx}}$) y el volumen al que apareció dicha concentración máxima ($V_{\text{máx}}$), junto con el porcentaje total de los enantiómeros lixiviados en columnas de suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP, ALPc, BC y SA-HDTMA.

Tratamientos		$C_{\text{máx}}$ (mg/l)	$V_{\text{máx}}$ (ml)	Lixiviado (%)
S2 (<i>S</i>-imazaquín)	<i>S</i> -imazaquín	0.10	90	88
S2 (<i>R</i>-imazaquín)	<i>R</i> -imazaquín	0.09	90	87
S2 (<i>Rac</i>-imazaquín)	<i>S</i> -imazaquín	0.10	90	88
	<i>R</i> -imazaquín	0.10	90	83
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.20	90	86
S2 + 2% ALP	<i>S</i> -imazaquín	0.08	90	74
	<i>R</i> -imazaquín	0.08	90	73
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.16	90	74
S2 + 2% ALPc	<i>S</i> -imazaquín	0.09	90	90
	<i>R</i> -imazaquín	0.09	90	84
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.19	90	87
S2 + 2% BC	<i>S</i> -imazaquín	0.06	90	64
	<i>R</i> -imazaquín	0.06	90	68
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.13	90	66
S2 + 1% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	0.09	98	83
	<i>R</i> -imazaquín	0.09	98	79
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.17	98	84
S2 + 5% SA-HDTMA	<i>S</i> -imazaquín	0.07	130	81
	<i>R</i> -imazaquín	0.07	130	78
	(<i>S</i> + <i>R</i>)-imazaquín	0.14	130	79

4.3.3.2. Lixiviación en los suelos enmendados con los residuos de almazara

En las Figuras 4.42 y 4.43 se han representado las curvas de elución relativas y acumuladas para los suelos S1 y S2 sin tratar y tratados con las enmiendas orgánicas. En el caso del suelo S1, los datos obtenidos para las columnas de suelo tratado con ALP no se han incluido, debido a la aparición de interferencias en los análisis que resultaron imposibles de eliminar. El tratamiento con las enmiendas no alteró la ausencia de enantioselectividad anteriormente observada en los suelos sin enmendar.

S1

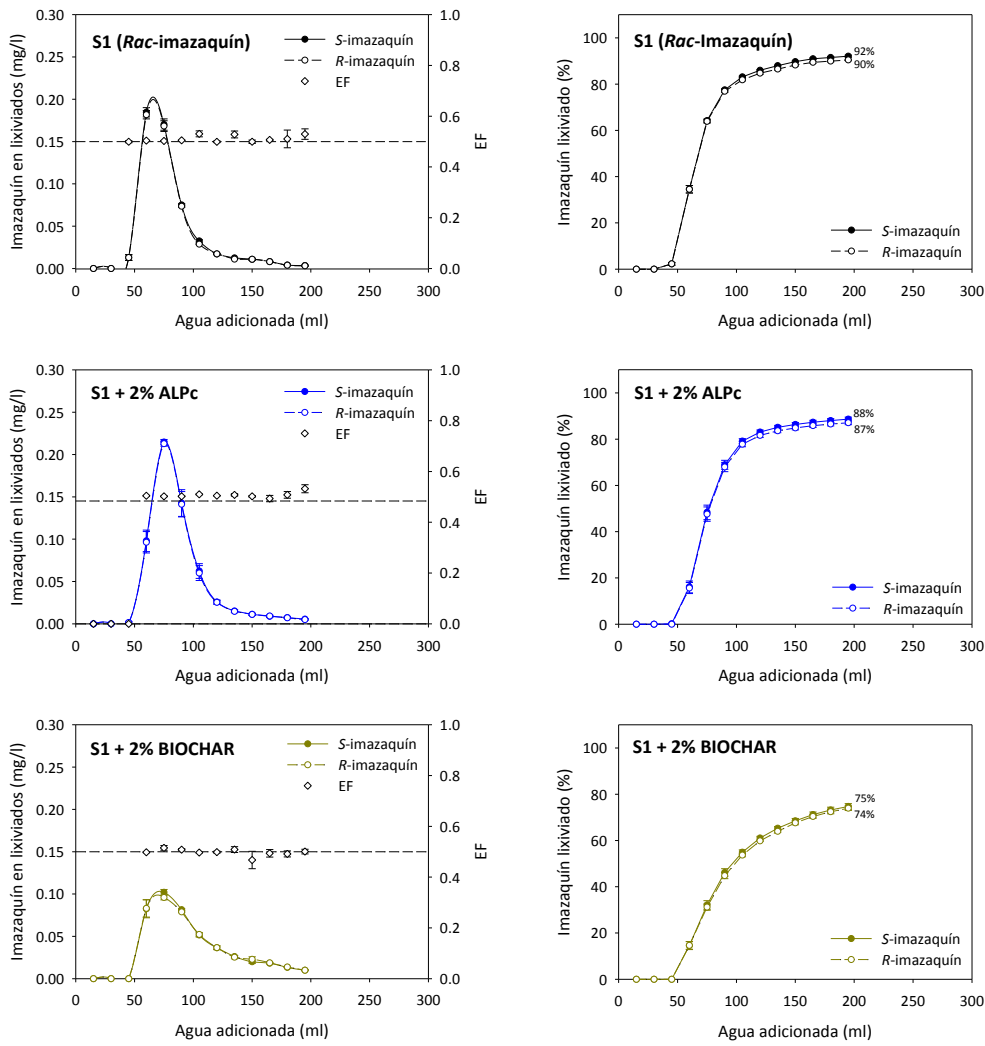


Figura 4.42. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S1 sin enmendar y enmendado con ALPc (2%) y BC (2%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidas en las curvas relativas.

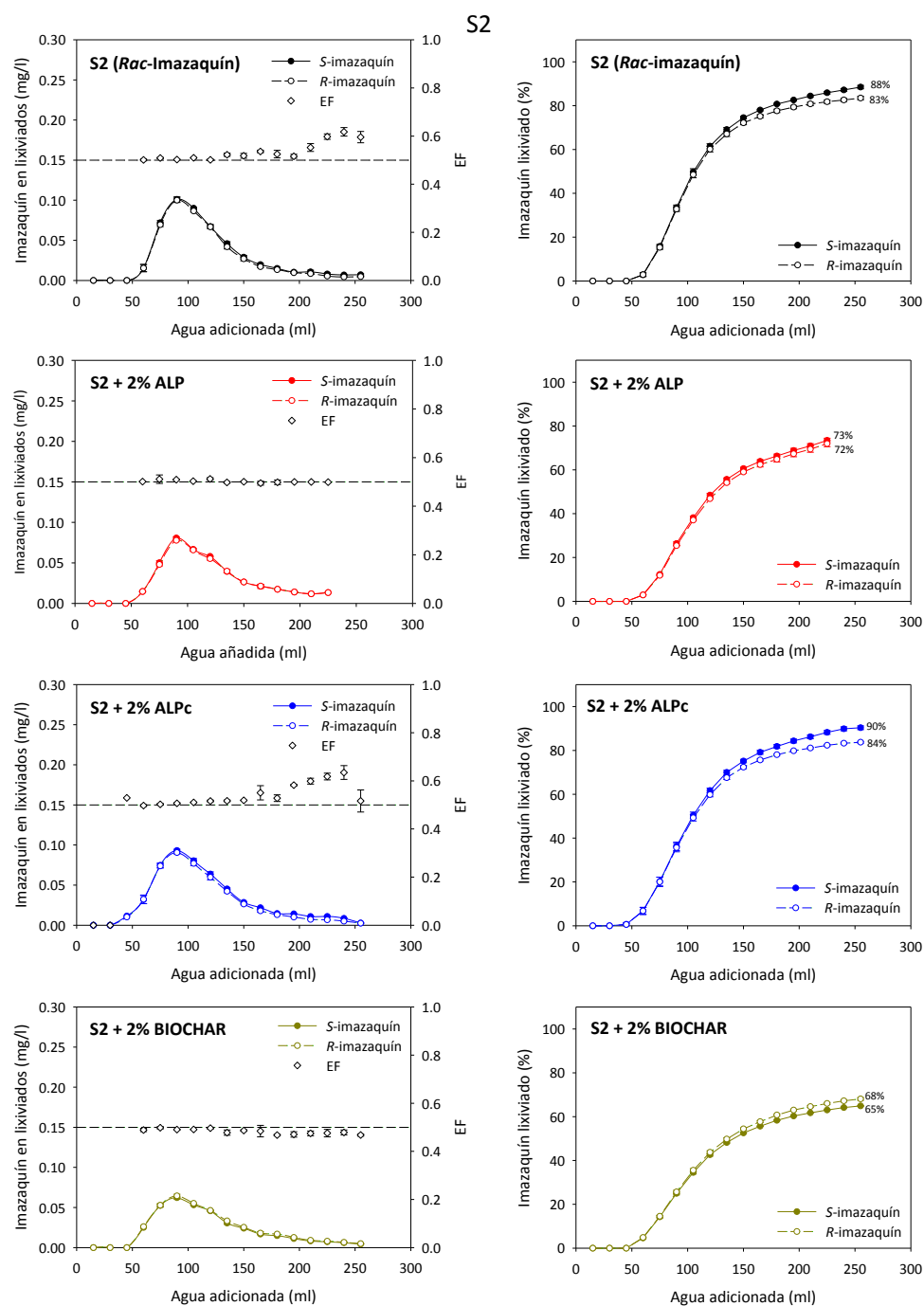


Figura 4.43. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S2 sin enmendar y enmendado con ALP (2%), ALPc (2%) y BC (2%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidas en las curvas relativas.

En el suelo S1 la adición de ALPc no supuso cambios significativos en la velocidad de lixiviación de los enantiómeros del imazaquín a través de la columna. Sin embargo, en el caso del suelo enmendado con BC, se obtuvieron unas curvas de elución relativas más achatadas que en el suelo sin enmendar para ambos enantiómeros. Puesto que el volumen de agua adicionado al cual aparece la concentración máxima de los enantiómeros del imazaquín en el suelo tratado con BC y sin tratar es, aproximadamente, el mismo, las diferencias en el valor de $C_{m\acute{a}x}$ se atribuyen a la más rápida degradación del herbicida en los suelos tratados con BC que en el suelo sin enmendar, pudiendo también haber contribuido procesos de adsorción lenta irreversibles a las partículas de BC. Esta menor persistencia en los suelos tratados con BC y/o adsorción irreversible se refleja también en los valores totales del herbicida lixiviado en el que sólo un 74-75% del herbicida adicionado es recuperado, frente al 90-92% lixiviado en las columnas de suelo sin enmendar (Tabla 4.34).

En el caso del suelo S2 los tratamientos con los residuos de almazara prácticamente no afectaron a la lixiviación de los enantiómeros del imazaquín, si se compara con el suelo sin enmendar (Tabla 4.35). Para todos los tratamientos, la $C_{m\acute{a}x}$ apareció tras haber añadido el mismo volumen de agua (90 ml). No obstante, se observaron ligeras diferencias en el valor de $C_{m\acute{a}x}$ dependiendo del residuo utilizado, las cuales pueden ser atribuidas a las pequeñas diferencias en las velocidades de degradación durante el periodo de lixiviación. Los valores de porcentaje total lixiviado de los enantiómeros indican que las columnas de suelo S2 enmendadas con BC lixivian un menor porcentaje de herbicida, seguido de las columnas enmendadas con ALP, siendo las columnas de S2 tratadas con ALPc aquellas que presentan un mayor % de S- y R-imazaquín lixiviados.

Los suelos de las columnas de S2 enmendados con ALP y BC fueron sustraídos de las columnas de vidrio, extraídos con fase móvil y medidos por HPLC enantioselectiva. Sin embargo, no se detectaron cantidades residuales en el suelo. Esto pudo deberse a que el porcentaje no lixiviado se degradó en la columna o quedó irreversiblemente retenido en los suelos enmendados, o bien a que, siendo la dosis de aplicación del herbicida muy pequeña (100-200 g/ha), las cantidades retenidas en el suelo estuvieron por debajo del límite de detección.

4.3.3.3. Lixiviación en los suelos enmendados con organo-arcilla

Las Figuras 4.44 y 4.45 muestran las curvas de elución relativas y acumuladas de los enantiómeros S y R para los suelos enmendados con la organo-arcilla a dos porcentajes de enmienda.

S1

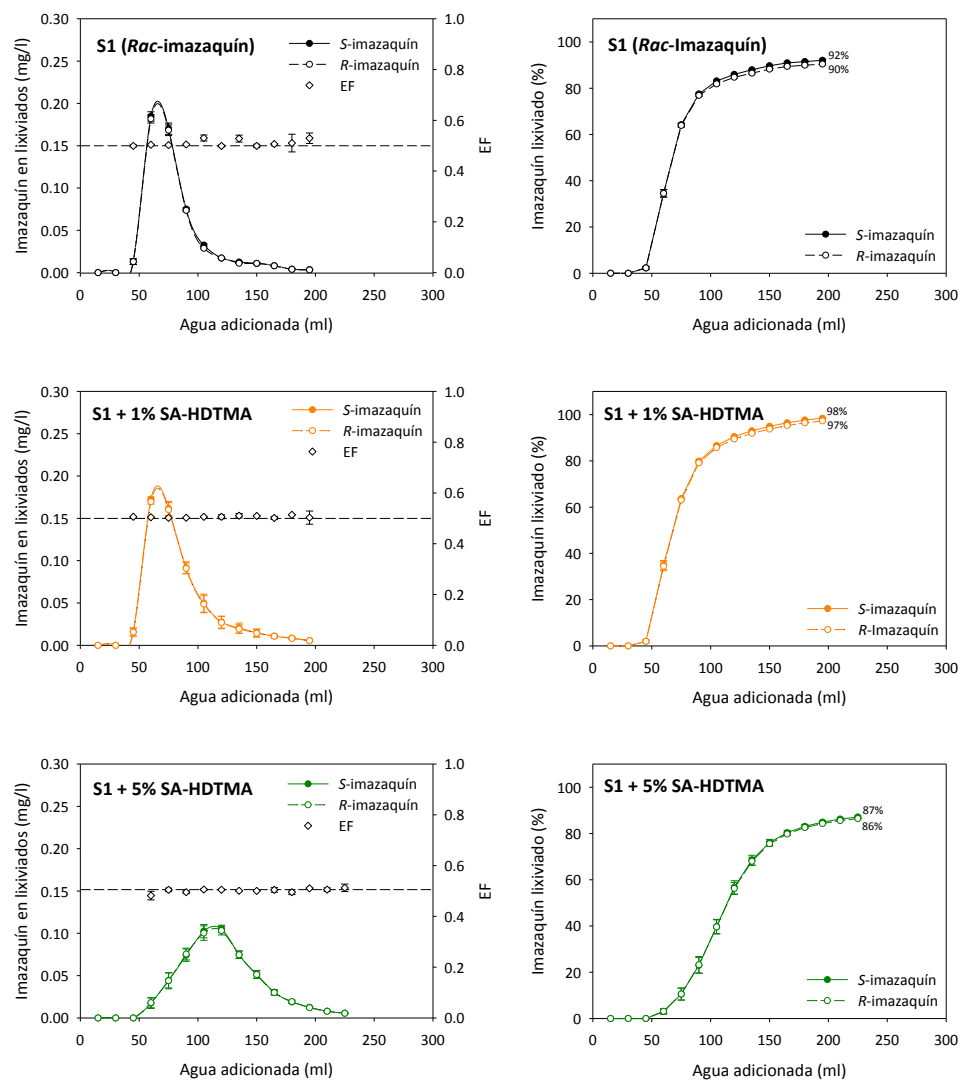


Figura 4.44. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S1 sin enmendar y enmendado con SA-HDTMA (1% y 5%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidas en las curvas relativas.

S2

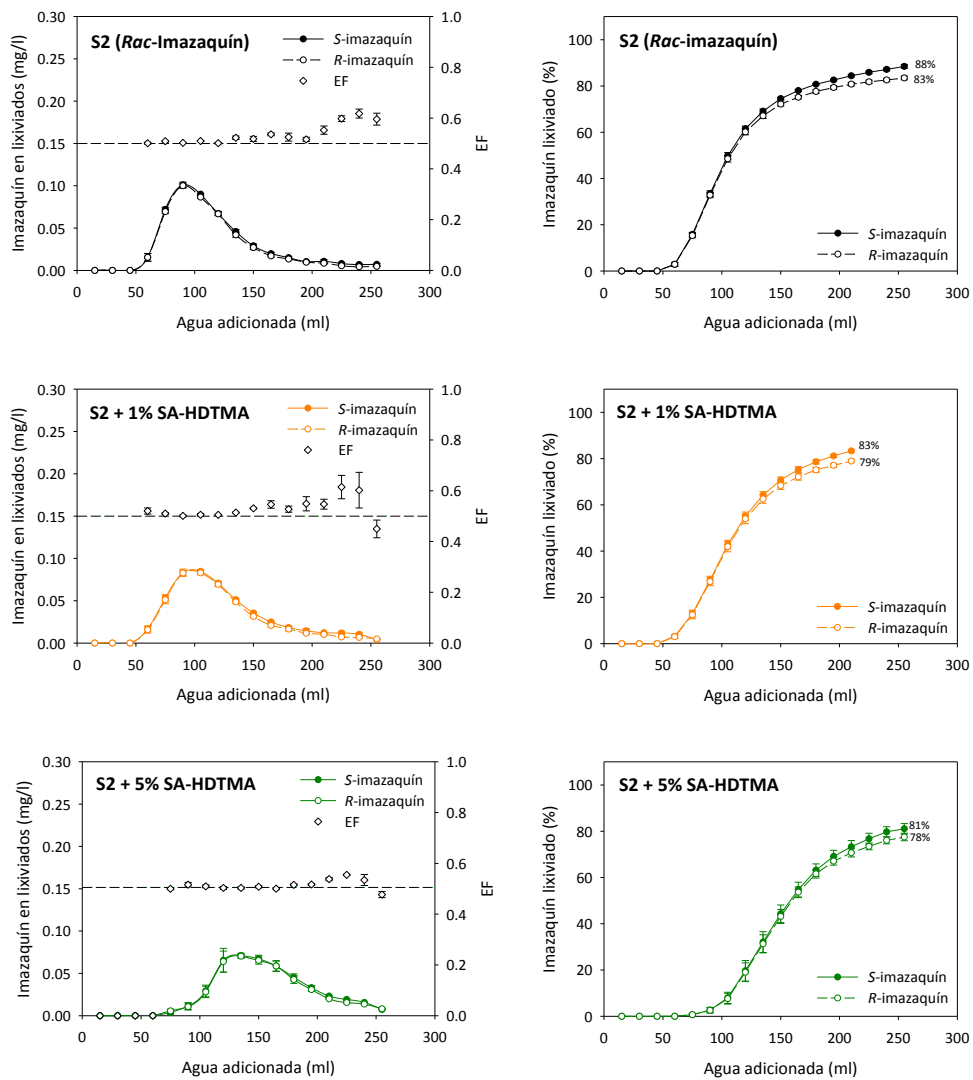


Figura 4.45. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para los enantiómeros del imazaquin aplicados como mezcla racémica a columnas del suelo S2 sin enmendar y enmendado con SA-HDTMA (1% y 5%). Las fracciones enantioméricas (EF) en los lixiviados están incluidas en las curvas relativas.

Las Figuras 4.44 y 4.45 muestran cómo la adición de la organo-arcilla SA-HDTMA en un porcentaje del 5% supuso un importante retraso en la lixiviación de los enantiómeros en ambos suelos. Asimismo, se observa que la adición de la organo-arcilla al 1% no fue suficiente, en ninguno de los dos suelos, para que se manifestaran diferencias en el movimiento del herbicida comparado con el suelo sin enmendar.

En el suelo S1 enmendado con SA-HDTMA al 5%, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ fue de 0.1 mg/l (para *S*- y *R*-imazaquín) y apareció tras añadir un volumen de agua de 115 ml (Tabla 4.34). Esta lenta lixiviación es consecuencia de la alta adsorción de los enantiómeros del imazaquín en la zona de la columna de suelo (0-2.5 cm) enmendada con la organo-arcilla.

El caso del suelo S2 es idéntico, pues la adición de SA-HDTMA en un porcentaje del 5% supuso una disminución de la velocidad del movimiento del herbicida al compararlo con el suelo S2 sin tratar (Tabla 4.35). En este suelo, el retraso de los enantiómeros del imazaquín es mayor si se compara con el suelo S1 enmendado. Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos en los experimentos de adsorción, donde el suelo S2 enmendado con SA-HDTMA tenía una capacidad de adsorción mayor a la del suelo S1 tratado con esta misma organo-arcilla.

4.3.3.4. Lixiviación en suelo tras la adición del herbicida en forma de complejo de SA-HDTMA y *R*-imazaquín

a) Caracterización de los complejos HT₅₀₀-Imazaquín y SA-HDTMA-Imazaquín

Cómo se mencionó en el apartado 4.3.1.1, tanto la muestra HT₅₀₀ como la muestra SA-HDTMA mostraron una elevada afinidad por los enantiómeros del imazaquín. Por ello, en un principio se consideró ambas arcillas como soportes para la liberación controlada del herbicida, preparándose complejos por reconstrucción en el caso de la HT₅₀₀ y por adsorción para la SA-HDTMA (apartado 3.1.3.3). Tras la síntesis de los complejos del herbicida imazaquín con las arcillas HT₅₀₀ y SA-HDTMA, se determinó la cantidad de imazaquín adsorbido en éstos de forma indirecta, a partir de la cantidad no adsorbida, así como de forma directa, mediante extracción del herbicida con una mezcla H₃PO₄ diluido (pH=2)/acetonitrilo 60:40 (v/v). Los resultados obtenidos a partir de ambos métodos se resumen en la Tabla 4.36.

Tabla 4.36. Contenido de imazaquín en los complejos arcillosos.

Complejo	% Imazaquín (método indirecto)	% Imazaquín (método directo)
HT-imazaquín	1.1	1.2
SA-HDTMA-imazaquín	0.8	0.6

Previamente a la realización de los experimentos, se volvió a medir el contenido de herbicida de los complejos. El contenido de imazaquín en el complejo con SA-HDTMA permaneció estable transcurrido 1 mes. Sin embargo, en el caso del complejo sintetizado a partir de la hidrotalcita calcinada (HT₅₀₀), se comprobó que la cantidad de imazaquín presente en el complejo se redujo en un 50% tras 12 días desde su síntesis. Por ello, se decidió obtener una cinética de degradación del herbicida soportado en esta muestra.

En la Figura 4.46 se representa la curva de degradación del imazaquín soportado en la hidrotalcita HT₅₀₀, junto a la curva de la degradación del herbicida en una disolución blanco ajustada a un valor de pH cercano al pH en el que se sintetizó el complejo HT-imazaquín (pH≈10). Se observó que el imazaquín se degradó a mayor velocidad cuando se encontraba en forma de complejo que en disolución acuosa alcalina. Los datos experimentales se ajustaron a una cinética de primer orden y se determinó el tiempo de vida media a partir de la expresión Ec. 3.5, obteniéndose un valor de 12 días para el complejo con HT y de más de 200 días en la disolución acuosa. Esta mayor velocidad de degradación en el complejo con HT pudo deberse a una catálisis alcalina en fase sólida de la hidrotalcita que favoreció la degradación del herbicida.

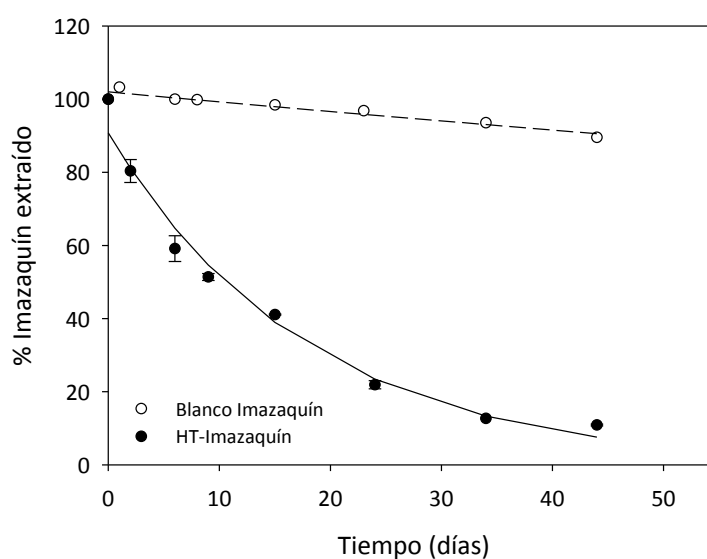


Figura 4.46. Cinética de degradación del imazaquín soportado en HT y en disolución acuosa de 30 ppm a pH 10.

b) Identificación del producto de degradación del imazaquín en el complejo HT-Imazaquín

Para identificar el producto resultante de la degradación del imazaquín, se midió mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS) el extracto obtenido tras dejar en reposo durante 54 días una muestra de complejo HT-imazaquín. La Figura 4.47 muestra el espectro de barrido completo medido sobre el extracto del complejo. Dicho espectro presenta dos picos: uno a un tiempo de 7.26 min que contiene un solo ion precursor de relación m/z igual a 312.3 Da, que corresponde al imazaquín, y un segundo pico a 6.36 min que presenta tres iones precursores de relación m/z igual a 285.1, 313.1 y 330.0 Da.

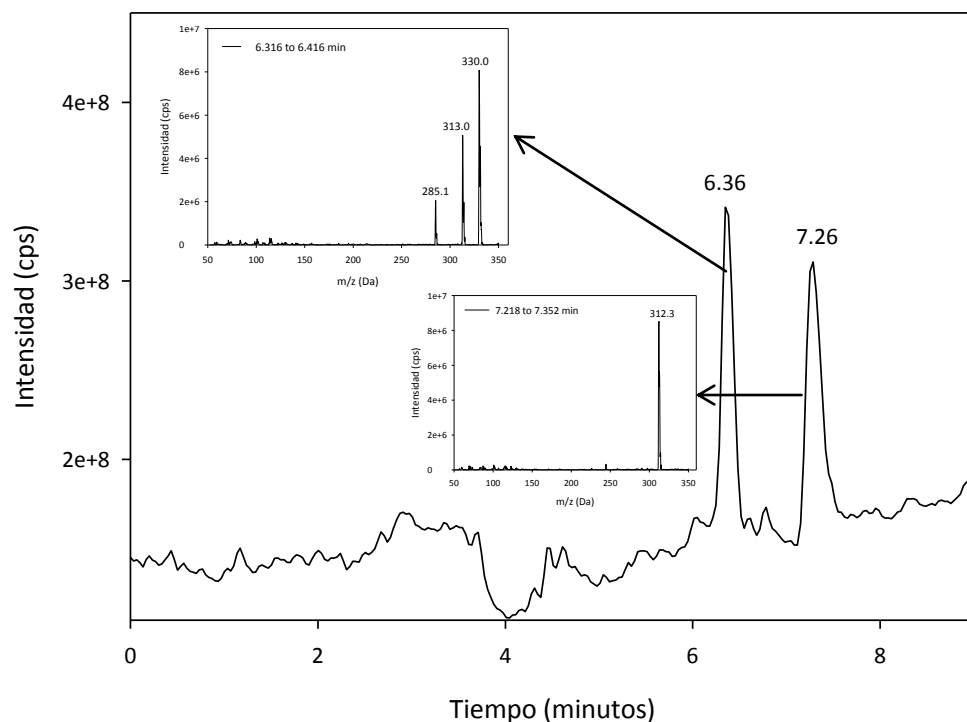


Figura 4.47. Espectro de masas del extracto del complejo HT-Imazaquin 54 días después de su síntesis.

De los tres iones precursores obtenidos del pico que aparece a 6.36 min, destaca el ion de relación carga masa 330.0 Da, ya que presenta una masa superior al peso molecular del imazaquin (311.3 g/mol). Por ello, se realizó un barrido de los iones productos que se obtienen tras la fragmentación de este ion precursor. El espectro MS/MS se representa en la Figura 4.48 y presenta un solo pico a 6.37 min. Entre todos los fragmentos que se observan, destacan dos con la misma relación m/z de los dos iones precursores observados en el barrido completo MS (Figura 4.47). Esto nos indica que estos dos iones eran, en realidad, fragmentos del ion precursor de 330.0 Da originados por su fragmentación en la fuente de ionización. Tras consultar la bibliografía, se identificó un producto de degradación denominado ácido 2-(1-carbamoil-1,2-dimetil-propil carbamoil)-quinolina-3-carboxílico (Figura 4.49), que es el producto principal de la hidrólisis alcalina del imazaquin formado por la apertura del anillo de imidazolinona (Terry et al., 1998).

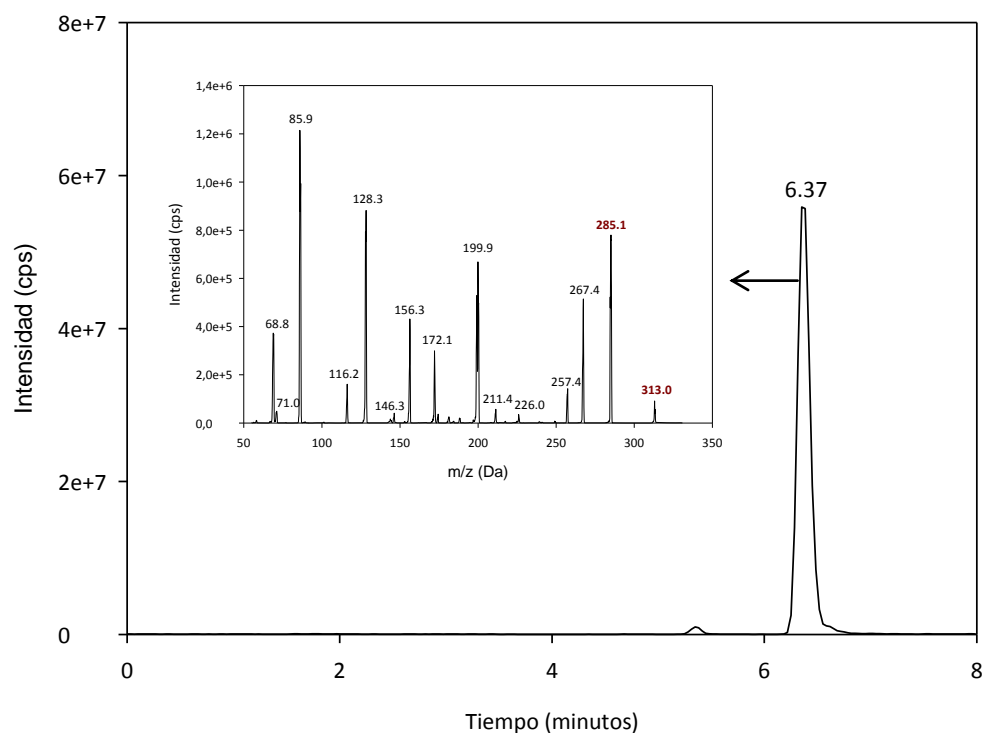


Figura 4.48. Espectro Masa/Masa para el ion precursor de $m/z = 330.0$ Da del extracto del complejo HT-Imazaquín 54 días después de su síntesis.

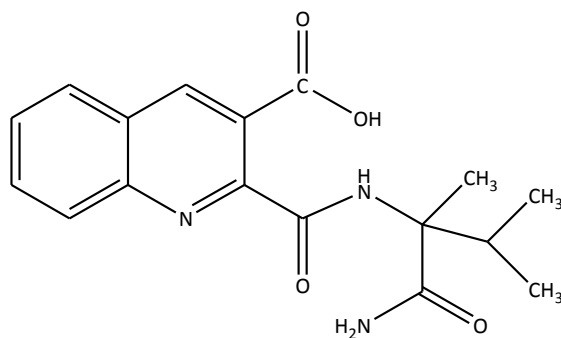


Figura 4.49. Estructura química del ácido 2-(1-carbamoyl-1,2-dimetil-propil carbamoyl)-quinolina-3-carboxílico

En la Figura 4.50 se muestra un posible mecanismo de degradación del imazaquín en el que se obtiene como producto de degradación el ácido 2-(1-carbamoyl-1,2-dimetil-propil carbamoyl)-quinolina-3-carboxílico. En un primer paso, se produce la hidroxilación del anillo imidazólico a través del C unido al N imínico y a continuación, el nitrógeno imidazólico de cicla con el C del grupo carboxílico. Seguidamente, tiene lugar una deshidratación que lleva a la formación de un intermedio cíclico (1), en el cual se produce la apertura del anillo dando el producto 2. Finalmente el producto 2 se hidroliza transformándose en el ácido 2-(1-carbamoyl-1,2-dimetil-propil carbamoyl)-quinolina-3-carboxílico (3). Este producto de degradación se caracteriza por ser muy soluble en agua y, al contrario que el imazaquín, no-fitotóxico (Teclé et al., 1993).

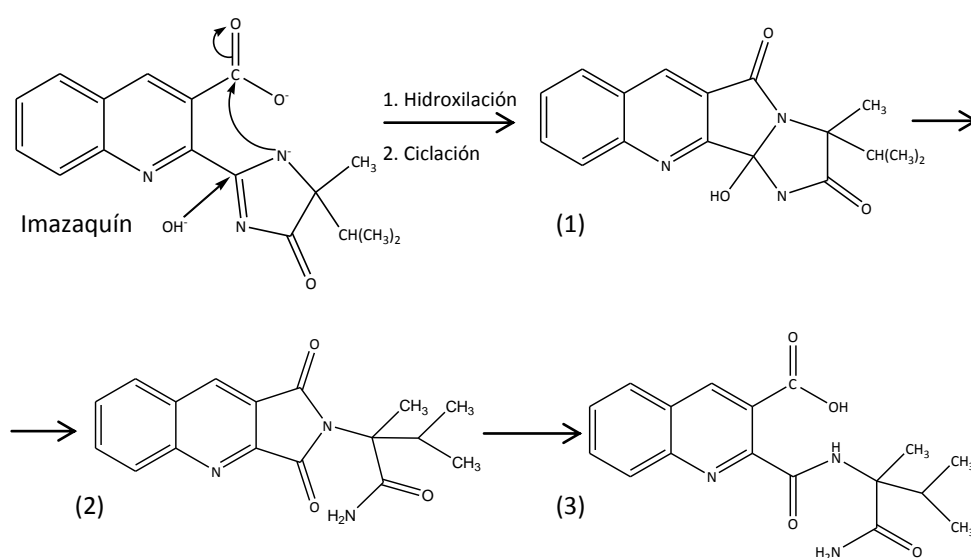


Figura 4.50. Mecanismo de degradación del imazaquín en medio alcalino.

c) Curvas de elución

En este apartado se presentan los resultados de los experimentos de lixiviación del imazaquín en columnas de suelo S2 aplicando el herbicida como mezcla racémica en disolución, el enantiómero *R* puro en disolución y el enantiómero *R* puro en forma de complejo con la organoarcilla SA-HDTMA (Figura 4.51, Tabla 4.37).

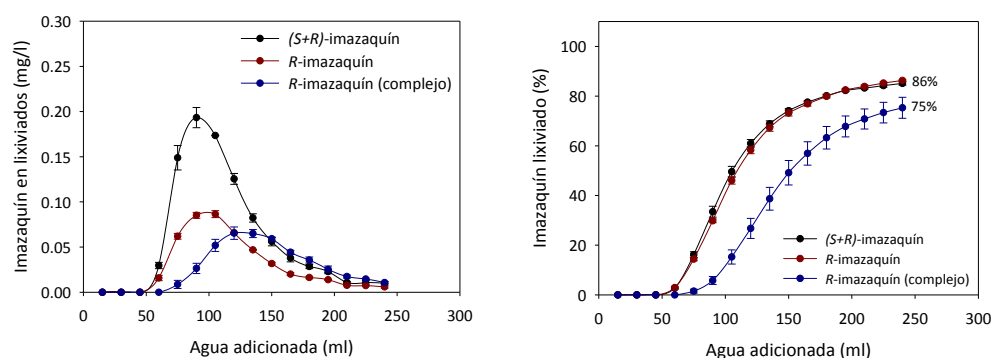


Figura 4.51. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para el imazaquín aplicado como mezcla racémica, como enantiómero puro activo (*R*) libre y como enantiómero puro en forma de complejo con SA-HDTMA a columnas del suelo S2 sin enmendar.

En las curvas de elución relativas se observa cómo el valor de la concentración máxima de imazaquín en los lixiviados ($C_{\text{máx}}$) se ve reducida por la aplicación del enantiómero activo libre (a mitad de dosis) y cómo esta reducción se ve acentuada al aplicar el enantiómero activo en forma de complejo con la organoarcilla SA-HDTMA. Además, se aprecia un retraso en el movimiento del imazaquín a través de las columnas cuando el enantiómero es aplicado en forma de complejo. Así, se observa una curva más achatada en la que la concentración máxima del herbicida aparece tras haber adicionado 125 ml de agua, mientras que en el caso del herbicida libre (tanto aplicado en forma de *rac*-imazaquín como en forma de *R*-imazaquín puro), la $C_{\text{máx}}$ aparece a un volumen de 90 ml (Tabla 4.37). En cambio, no hubo diferencia en la velocidad de lixiviación del imazaquín cuando fue aplicado en forma de mezcla racémica o como enantiómero puro. La curva de elución acumulada muestra cómo en columnas en las que se ha aplicado el complejo la cantidad total de enantiómero lixiviado (75%) es menor que en el caso de las columnas en las que el herbicida se adicionó en forma libre (86%). La lenta movilidad observada cuando se aplica el complejo se atribuye a una liberación progresiva del enantiómero en el suelo que da lugar a un retraso en su lixiviación. De este modo, se concluye que la aplicación del enantiómero activo puro en disolución en lugar de la mezcla racémica supone una mejora al reducir la cantidad de imazaquín total lixiviado. Además, la aplicación del *R*-imazaquín en forma de complejo retrasa la lixiviación del herbicida y aumenta su tiempo de residencia en el suelo, lo cual supondría un incremento en la eficacia biológica del imazaquín al reducir las pérdidas de éste por lixiviación.

Tabla 4.37. Concentración máxima de imazaquín en los lixiviados ($C_{\text{máx}}$) y el volumen al que apareció dicha concentración máxima ($V_{\text{máx}}$), junto con el porcentaje total lixiviado en columnas de suelo S2 sin enmendar.

		$C_{\text{máx}}$ (mg/l)	$V_{\text{máx}}$ (ml)	Lixiviado (%)
Mezcla racémica	(<i>S+R</i>)-imazaquín	0.19	90	86
Puro	<i>R</i> -imazaquín	0.10	90	86
Complejo	<i>R</i> -imazaquín	0.06	125	75

4.3.4. Bioensayos: eficacia biológica

Sobre la base de los resultados obtenidos en los experimentos de laboratorio, se diseñaron dos bioensayos para evaluar la eficacia biológica del imazaquín. Los bioensayos se realizaron en el suelo S2 sin enmendar y se utilizó como planta sensible al herbicida el Brócoli Romanesco Natalino (*Brassica oleracea botrytis*).

4.3.4.1. Bioensayo general

Se estudió la acción herbicida de cada uno de los dos enantiómeros del imazaquín aplicados por separado a tres dosis diferentes (1, 2 y 5 g/ha). Se plantaron 12 semillas de Brócoli Romanesco Natalino e inmediatamente después, se aplicó la disolución acuosa del enantiómero correspondiente. En paralelo, se prepararon macetas control, a las cuales no se adicionó el herbicida. La eficacia de cada uno de los enantiómeros se evaluó mediante la comparación de la longitud de raíz, altura de tallo y biomasa de la parte aérea de las plantas germinadas dos semanas después de la aplicación del herbicida.

La aplicación de ambos enantiómeros puros no afectó a la germinación de las semillas (Figura 4.52a), sin embargo, sí se observó una disminución de la longitud de las raíces al comparar las macetas tratadas con el control, siendo este efecto proporcional a la dosis de herbicida aplicada (Figura 4.52b).

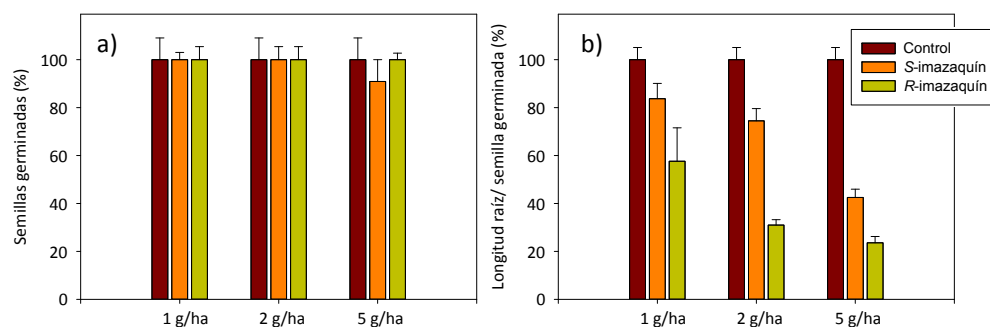


Figura 4.52. Porcentaje de semillas germinadas (a) y longitud de las raíces (b) respecto al control dos semanas después de la aplicación de los enantiómeros individuales de imazaquín a tres dosis diferentes (1, 2 y 5 g/ha).

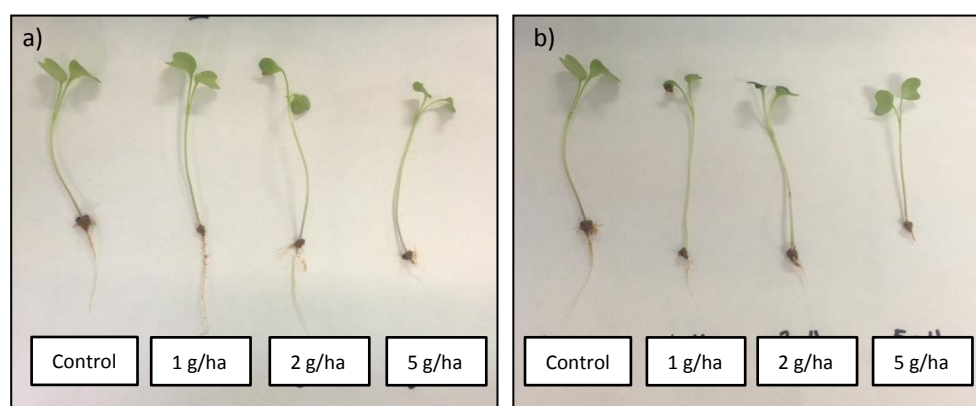


Figura 4.53. Plantas obtenidas en los bioensayos dos semanas después de la aplicación del enantiómero *S* (a) y *R* (b) del imazaquín a tres dosis distintas (1, 2 y 5 g/ha).

En la Figura 4.53 se observa que, además de la disminución del tamaño de la raíz principal, tiene lugar una inhibición en el desarrollo de raíces secundarias y pelos absorbentes. Así, se reduce el área superficial de absorción de las raíces de modo que las plantas están incapacitadas para tomar los nutrientes necesarios, lo cual lleva a un anormal crecimiento de las plantas o la muerte de las mismas.

Las Figuras 4.52b y 4.53 muestran una mayor inhibición en el crecimiento de las raíces cuando se aplicó el *R*-imazaquín si se compara con el *S*-imazaquín. Esta menor longitud de la raíz conllevó a una menor altura de los tallos (Figura 4.54a) y una

menor cantidad de biomasa (Figura 4.54b) en aquellas macetas tratadas con el enantiómero *R*. De hecho, fue la mayor actividad biológica mostrada en el bioensayo por el segundo pico obtenido en el proceso de purificación de los enantiómeros del imazaquín (ver apartado 3.1.1.2) la que nos permitió asociar el mismo al enantiómero *R*, sobre el que se sabe que recae principalmente la actividad biológica de las imidazolinonas (Ramezani et al., 2010).

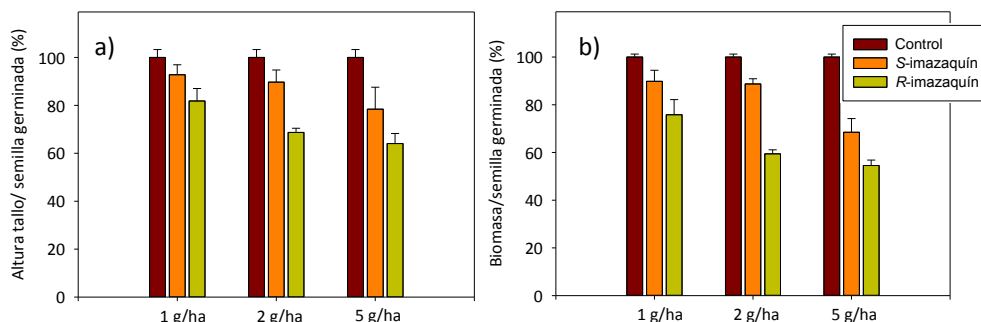


Figura 4.54. Porcentaje de altura de tallo (a) y biomasa (b) respecto al control tras la aplicación del herbicida a tres dosis diferentes (1, 2 y 5 g/ha).

Efectos biológicos similares a los observados en este trabajo han sido descritos en el uso de otros herbicidas del grupo de las imidazolinonas como el imazetapir en arroz (Qian et al, 2009) y en maíz (Zhou et al., 2009) o el imazamox en maíz (Wei et al., 2015). Las imidazolinonas son plaguicidas que inhiben la biosíntesis de la enzima acetohidroxiácido sintasa, la cual cataliza reacciones que intervienen en la ruta biosintética de las cadenas ramificadas de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina (Zhou et al., 2009).

Los resultados ponen de manifiesto la mayor efectividad herbicida del *R*-imazaquín frente al *S*-imazaquín y cómo dicha efectividad es proporcional a la dosis de aplicación del enantiómero. Por lo tanto, el uso del enantiómero puro en lugar de la mezcla racémica permitiría reducir la dosis de aplicación necesaria para el control de la mala hierba a combatir.

4.3.4.2. Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación: aplicación del herbicida libre y soportado en SA-HDTMA

Se evaluó la eficacia biológica del imazaquín al ser aplicado en forma de mezcla racémica, como enantiómero activo puro (*R*) libre y como enantiómero activo puro (*R*) en forma de complejo con la organoarcilla SA-HDTMA. Para ello, se utilizaron macetas de 36 cm² rellenas con suelo S2, a las cuales se les aplicó una dosis de 80 g/ha de imazaquín racémico o 40 g/ha de enantiómero activo (*R*) purificado bien libre bien soportado en la organoarcilla SA-HDTMA. A continuación, se adicionó a cada una de las macetas 150 ml de agua destilada, equivalente a unos 40 l/m². Las macetas se dejaron drenar durante 24 horas y el lixiviado fue recogido y analizado por HPLC enantioselectiva. Seguidamente, se plantaron 12 semillas de Brócoli Romanesco Natalino (*Brassica oleraceae botrytis*) y se determinó la eficacia herbicida del imazaquín en sus diferentes formas de aplicación durante las dos semanas posteriores.

El porcentaje de imazaquín lixiviado en las macetas en las que el herbicida fue adicionado en disolución fue del $96 \pm 1\%$ y $98 \pm 1\%$ para la mezcla racémica y el enantiómero activo (*R*) puro, respectivamente. En el caso de las macetas a las que se les añadió el complejo, sólo lixivió el $29 \pm 6\%$ del *R*-imazaquín añadido.

Al igual que en el bioensayo anterior, para evaluar la eficacia se determinó la longitud de las raíces, la altura de los tallos y la biomasa de la parte aérea de las plantas dos semanas después de la sembrar las semillas.

En la Figura 4.55 se ha representado la longitud media de las raíces de las plantas germinadas obtenida para cada uno de los tratamientos. La longitud de las raíces al aplicar el enantiómero activo en forma de complejo se redujo en un 80% respecto al control, frente a una disminución de sólo el 48% y el 33% observada en las plantas en las que se aplicó el herbicida racémico y el *R*-imazaquín puro libre, respectivamente (Figura 4.55 y 4.56). Esto dio como resultado un tamaño de tallo menor en las macetas tratadas con el complejo respecto a las macetas en las que el herbicida se adicionó de forma libre (Figura 4.57 y 4.58a). Esta mayor efectividad también se observa en el porcentaje de biomasa obtenida, donde se da una reducción del 37% en las plantas en las que se adicionó el *R*-imazaquín soportado sobre SA-HDTMA respecto al control, mientras que la disminución del porcentaje de biomasa cuando se aplica en forma de disolución fue del 9% y 5% al aplicar la mezcla racémica y el enantiómero puro en disolución, respectivamente (Figura 4.58b). Si se compara el

efecto del enantiómero activo cuando se adiciona como mezcla racémica o como enantiómero puro en disolución, se observa que el efecto sobre el crecimiento de la raíz es más significativa en el caso de la mezcla racémica (Figura 4.55). Esto es consecuencia de que el enantiómero *S*-imazaquín también presenta cierta actividad herbicida, aunque menor que la del enantiómero *R*.

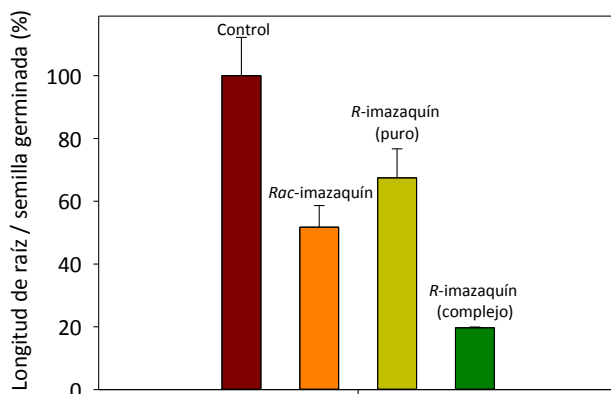


Figura 4.55. Longitud de las raíces tras la aplicación del herbicida como mezcla racémica (80 g/ha), como enantiómero *R* puro libre (40 g/ha) y como enantiómero *R* puro en forma de complejo (40 g/ha).

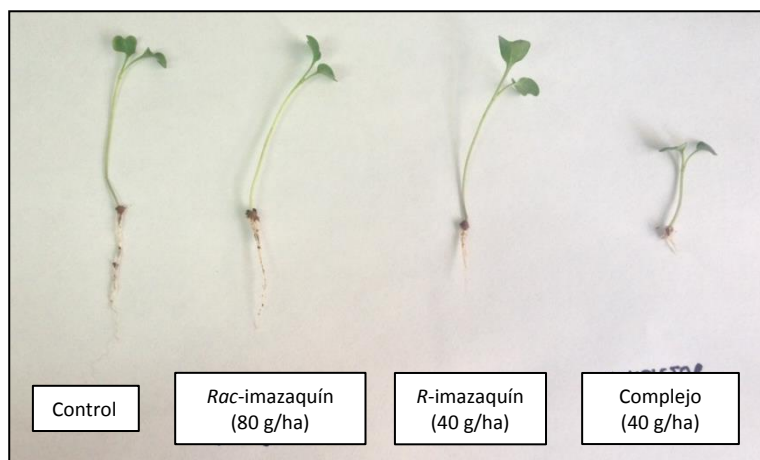


Figura 4.56. Ejemplo de plantas obtenidas dos semanas después de la aplicación de los enantiómeros del imazaquín en forma de mezcla racémica (80 g/ha), como enantiómero *R* puro libre (40 g/ha) y como enantiómero *R* puro en forma de complejo (40 g/ha).



Figura 4.57. Resultados de los bioensayos realizados en el suelo S2 con Brócoli Romanesco Natalino (*Brassica oleracea botrytis*). Efecto de aplicación de los enantiómeros del imazaquín en forma de mezcla racémica (80 g/ha), como enantiómero *R* puro libre (40 g/ha) y como enantiómero *R* puro en forma de complejo (40 g/ha).

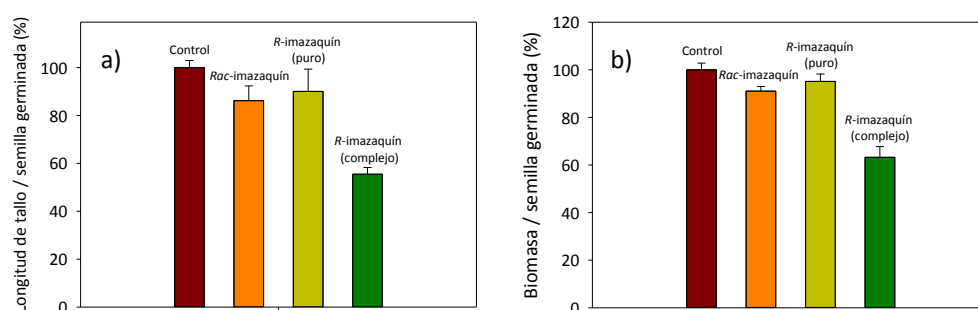


Figura 4.58. Porcentaje de altura de tallo (a) y biomasa (b) respecto al control tras la aplicación de los enantiómeros del imazaquín en forma de mezcla racémica (80 g/ha), como enantiómero *R* puro libre (40 g/ha) y como enantiómero *R* puro en forma de complejo (40 g/ha).

En vista de los resultados obtenidos, se concluye que en un supuesto caso real análogo al simulado en este experimento, es decir, un episodio de lluvias abundantes poco después de la aplicación del herbicida al suelo, podría haber sido necesaria una segunda aplicación de la mezcla racémica o del enantiómero puro libre para un óptimo control de la plaga objetivo, ya que gran parte del herbicida se lixiviaría. Por el contrario, estas pérdidas por lixiviación habrían disminuido al aplicar el enantiómero puro soportado sobre la organo-arcilla, lo que supondría un aumento en la efectividad del herbicida, incluso a mitad de dosis respecto a la mezcla racémica, ya que se liberaría lentamente al suelo.

4.3.5. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio enantioselectivo del comportamiento del herbicida imazaquín

El comportamiento del imazaquín en los dos suelos estudiados no mostró una marcada enantioselectividad en ninguno de los procesos evaluados (adsorción, degradación y lixiviación). No se detectó adsorción de los enantiómeros en los suelos sin enmendar y su persistencia en ellos fue muy elevada. Esto supuso que ambos enantiómeros lixiviaran rápidamente a través del suelo, recuperándose altos porcentajes de ambos. Se observó que la degradación de los enantiómeros fue más rápida cuando se aplicaron en forma pura en lugar de en forma de mezcla racémica y no presentó enantiomerización de *S*- a *R*-imazaquín ni viceversa.

La adición de residuos orgánicos (ALP, ALPc y BC) no mejoró la adsorción de los enantiómeros en los suelos, sin embargo el aporte de materia orgánica y microorganismos exógenos con las enmiendas aumentaron la velocidad de degradación de los mismos. De este modo, el tratamiento con estos residuos podría ser una buena estrategia para reducir la elevada persistencia de los enantiómeros del imazaquín en suelos.

Por el contrario, la enmienda de los suelos con la organo-arcilla SA-HDTMA supuso un aumento en la adsorción de los enantiómeros y, como consecuencia, disminuyó la velocidad de degradación y lixiviación del *S*- y *R*-imazaquín. Así, se puede considerar a la organo-arcilla como una enmienda eficiente para la inmovilización de los enantiómeros del imazaquín en los suelos y con ello reducir su potencial contaminación por lixiviación.

La aplicación de *R*-imazaquín en lugar de la mezcla racémica supondría una reducción de la dosis de aplicación, al recaer sobre este enantiómero la mayor parte de la actividad herbicida y no darse interconversión en el enantiómero *S*. De este modo, se daría una disminución en la cantidad de imazaquín lixiviado, la cual sería aún menor si el enantiómero activo se aplica soportado en la organo-arcilla formando un complejo. La reducción de las pérdidas del herbicida al usar el complejo supondría un incremento de la efectividad biológica del mismo, efecto especialmente útil en los casos en los que se produzcan episodios de lluvia abundante tras la aplicación del herbicida.

5. CONCLUSIONES



A partir de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- **Caracterización de los adsorbentes**

1. La caracterización de los residuos de almazaras seleccionados en este estudio sugiere notables diferencias en las propiedades del alperujo fresco (ALP), del alperujo compostado (ALPc) y del biochar procedente del ALPc (BC) como consecuencia de los tratamientos de compostaje y pirólisis. Dichos tratamientos aumentan el pH y el índice de humificación y reducen el contenido en materia orgánica total y soluble respecto al alperujo fresco.
2. La caracterización de las arcillas y organo-arcillas preparadas confirmaron la capacidad de la montmorillonita y la hidrotalcita de incorporar en sus interláminas los iones orgánicos seleccionados: elaidato (ELA) y oleato (OLE) en el caso de la hidrotalcita y hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) en el caso de la montmorillonita. La incorporación de estos iones orgánicos da lugar a un importante incremento en el espaciado basal de las arcillas.

- **Estudio enantioselectivo del comportamiento del fungicida metalaxil**

3. La adsorción del metalaxil en los suelos estudiados (S1 y S2) no fue enantioselectiva, dándose una mayor adsorción de los dos enantiómeros del fungicida en el suelo con mayor contenido en arcilla (S1). La persistencia del metalaxil en los suelos sí presentó enantioselectividad, con una degradación más rápida del enantiómero *R* (activo) que del *S* (inactivo), sobre todo en el suelo S2, en el que el fungicida presentó una mayor disponibilidad para ser biodegradado. La menor adsorción y persistencia de los enantiómeros del metalaxil en el suelo S2 dio lugar a una lixiviación más rápida y más enantioselectiva en este suelo al compararla con la observada en el suelo S1.
4. Una segunda aplicación de metalaxil al suelo S2 aumentó la persistencia del enantiómero *S* y redujo la del *R*. Un aumento de la dosis de aplicación del fungicida a 20 mg/kg aumentó la persistencia de los dos enantiómeros respecto a la observada a una dosis de 2 mg/kg.

5. La adición de residuos de almazaras (ALP y ALPc) no supuso cambios significativos en la adsorción del metalaxil en ninguno de los suelos ni alteró su carácter no enantioselectivo. El efecto en la persistencia dependió de la naturaleza del residuo y del suelo al que éste fue aplicado, así como del enantiómero considerado. En general, la lixiviación de los enantiómeros del metalaxil en los suelos enmendados con los residuos fue consistente con el efecto de éstos en la persistencia de los enantiómeros.
 6. La adición de organo-hidrotalcita (HT-ELA) en un porcentaje del 1% incrementó notablemente la adsorción de los dos enantiómeros del metalaxil en los dos suelos. El aumento de la adsorción prolongó la persistencia de los dos enantiómeros y redujo la velocidad de lixiviación de ambos, demostrando el poder inmovilizador de la organo-hidrotalcita.
 7. El experimento realizado en parcelas experimentales confirmó, bajo condiciones reales de campo, el poder inmovilizador de la organo-hidrotalcita para los dos enantiómeros del metalaxil. La adición de organo-hidrotalcita afectó a la composición enantiomérica de los residuos del plaguicida al ejercer un efecto protector frente a los procesos biodegradativos.
- **Estudio enantioselectivo del comportamiento del herbicida imazaquín**
8. Los procesos de adsorción, disipación y lixiviación del herbicida imazaquín en los suelos estudiados presentaron una escasa enantioselectividad. Los dos enantiómeros del imazaquín mostraron una baja adsorción y una elevada persistencia y lixiviación en los suelos.
 9. La velocidad de degradación de los enantiómeros del imazaquín al aplicarlos como isómeros puros fue mayor que la observada al aplicarlos en forma racémica, no observándose procesos de interconversión entre los enantiómeros. La aplicación de una segunda dosis de imazaquín racémico al suelo S2 no supuso cambios sustanciales en las velocidades de degradación de los enantiómeros respecto a las obtenidas tras la primera aplicación.

10. La adición de los residuos de almazaras (ALP, ALPc y BC) no mejoró de forma significativa la adsorción de los enantiómeros del imazaquín a los suelos. La degradación en los suelos enmendados mantuvo una escasa enantioselectividad y todos los residuos provocaron un aumento de la velocidad de degradación de los enantiómeros, que se atribuyó a cambios en la actividad microbiológica de los suelos tras el aporte de los residuos. La velocidad de lixiviación de los enantiómeros en los suelos enmendados se mantuvo elevada, con una buena correspondencia entre las cantidades totales lixiviadas y el efecto de cada enmienda en la persistencia de los enantiómeros.
11. La adición de organo-arcilla (SA-HDTMA) en un porcentaje del 5% consiguió mejorar la escasa adsorción de los dos enantiómeros del imazaquín en ambos suelos. El aumento en la adsorción provocó un aumento de la persistencia de ambos enantiómeros y un notable retraso en su lixiviación, demostrando el poder inmovilizador de la organo-arcilla para los enantiómeros del herbicida.
12. La aplicación del enantiómero activo puro (*R*-imazaquín) en lugar de la mezcla racémica permite reducir las dosis de aplicación del imazaquín y, por tanto, reducir el riesgo de contaminación por lixiviación del herbicida. Las pérdidas por lixiviación lograron reducirse aún más por la aplicación de una formulación novedosa basada en el enantiómero activo pre-adsorbido en la organo-arcilla SA-HDTMA. Ensayos de eficacia biológica realizados con plantas sensibles demostraron que la reducción de las pérdidas de enantiómero activo al usar el mismo soportado en la organo-arcilla puede evitar la necesidad de nuevas aplicaciones de herbicida tras eventos de abundantes lluvias poco después de una primera aplicación.

En resumen, los resultados del presente trabajo ilustran los cambios que puede sufrir el comportamiento en el suelo de los enantiómeros de dos plaguicidas quirales, uno con una marcada enantioselectividad (metalaxil) y otro escasamente enantioselectivo (imazaquín), como consecuencia de las prácticas agrícolas adoptadas y/o condiciones de aplicación. En el caso de que el comportamiento del plaguicida muestre una marcada enantioselectividad, tratar a los enantiómeros del plaguicida

5. CONCLUSIONES

como si se trataran de un único compuesto puede llevar a importantes errores en la predicción de la eficacia biológica y del impacto ambiental del plaguicida. En caso contrario, el tratamiento individualizado de los enantiómeros sigue siendo necesario para establecer la idoneidad de aplicar exclusivamente el enantiómero activo en vez de la mezcla racémica con el fin de evitar la innecesaria incorporación al medio ambiente de una fracción no activa pero potencialmente contaminante.

6. BIBLIOGRAFÍA



- Acosta-Martínez V. & Tabatabai M.A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, **31**, 85-91.
- Aguer J.P., Hermosín M.C., Calderón M.J. & Cornejo J. (2000). Fenuron sorption by homoionic natural and modified smectites. *Journal of Environmental Science and Health B*, **35**, 279-296.
- Ahmad M., Rajapaksha A.U., Lim J.E., Zhang M., Bolan N., Mohan D., Vithanage M., Lee S.S. & Ok Y.S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, **99**, 19-33.
- Aichberger H., Loibner A.P., Celis R., Braun R., Ottener H. & Rost H. (2006). Assessment of factors governing biodegradability of PAHs in three soils aged under field conditions. *Soil and Sediment Contamination*, **71**, 253-259.
- Aichele T.M & Penner D. (2005). Adsorption, desorption and degradation of imidazolinones in soil. *Weed Technology*, **19**, 154-159.
- Albarrán A., Celis R., Hermosín M.C., López-Piñeiro A., Ortega-Calvo J.J & Cornejo J. (2003). Effect of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use and Management*, **19**, 150-156.
- Alburquerque J.A., González J., García D. & Cegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, **91**, 195-200.
- Alburquerque J.A., González J., García D. & Cegarra J. (2006) Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere*, **64**, 470-477.
- Ali H. & Aboul-Enein H.Y. (2004). Chiral Pollutants: Biotransformation, Biodegradation and Metabolism. En: *Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 75-103.
- Azam F., Fuhr F. & Mittelstaedt W. (1998). Fate of [Carbonyl-C-14]Methabenzthiazuron in an arid region soil – Effect of organic amendment, soil disturbance and fumigation. *Plant and Soil*, **107**, 149-158.

Badaluco L., Rao M., Colombo C., Palumbo G., Laudicina V.A. & Gianfreda L. (2010). Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biology and Fertility of Soils*, **46**, 481-489.

Barkani H., Catastini C., Emmelin C., Sarakha M., Azzouzi M.E. & Chovelon J.M. (2005). Study of the phototransformation of imazaquin in aqueous solution: a kinetic approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **170**, 27-35.

Barriga C., Gaitán M., Pavlovic I., Ulibarri M.A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2002). Hydrotalcites as sorbent for 2,4,6-trinitrophenol: influence of the layer composition and interlayer anion. *Journal of Materials Chemistry*, **12**, 1027-1034.

Barriuso E., Laird D.A., Koskinen W.C. & Dowdy R.H. (1994). Atrazine desorption from smectites. *Soil Science Society of American Journal*, **58**, 1632-1638.

Barriuso E., Houot S. & Serra-Wittling C. (1997). Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. *Pesticide Science*, **49**, 65-75.

Barriuso E., Andrades M.S., Benoit P. & Houot S. (2011). Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry*, **106**, 117-133.

Basham G.W. & Lavy T.L. (1987). Microbial and photolytic dissipation of imazaquin in soil. *Weed Science*, **35**, 865-870.

Beck A.J., Johnston A.E.J. & Jones K.C. (1993). Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **23**, 219-248.

Bending G.D. & Rodriguez-Cruz M.S. (2007). Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon. *Chemosphere*, **66**, 664-671.

Best J.A., Weber J.B. & Monaco T.J. (1975). Influence of soil pH on s-triazine availability to plants. *Weed Science*, **23**, 378-382.

Beulke B. & Brown C.D. (2001). Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling. *Biology and Fertility of Soils*, **33**, 558-564.

Bidleman T.F., Jantunen L.M., Harner T., Wiberg K., Wideman J.L., Brice K., Su K., Falconer R.L., Aigner E.J., Leone A.D., Ridal J.J., Kerman B., Finizio A., Alegria H.,

Parkhurst W.J. & Szeto S.Y. (1998). Chiral pesticides as tracers of air-surface exchange. *Environmental Pollution*, **102**, 43-49.

Botterweck J., Claßen D., Thordis Z., Gottfroh C., Kalathoor R., Schäffer A., Schwarzbauer J. & Schmidt B. (2014). A correlation between the fate and non-extractable residue formation of ^{14}C -metalaxyl and enzymatic activities in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **49**, 69-78.

Brixie J.M. & Boyd S.A. (1994). Treatment of contaminated soils with organoclays to reduce leachable pentachlorophenol. *Journal of Environmental Quality*, **23**, 1283-1290.

Brown G. (1961). The X-Ray Identification and Crystal Structure of Clay Minerals. Mineralogical Society, London.

Bruna F., Pavlovic I., Celis R., Barriga C., Cornejo J. & Ulibarri M.A. (2008). Organohydrotalcites as novel supports for the slow release of the herbicide terbutylazine. *Applied Clay Science*, **42**, 194-200.

Bruna F., Celis R., Real M. & Cornejo J. (2012). Organo/LDH nanocomposite as an adsorbent of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and soil-water systems. *Journal of Hazardous Materials*, **225–226**, 74–80.

Buerge I.J., Poiger T., Müller M.D. & Buser H. (2003). Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH. *Environmental Science & Technology*, **37**, 2668-2674.

Bundt A.C., Avila L.A., Pivetta A., Agostinetto D., Dick D.P. & Burauel P. (2015). Imidazolinone degradation in soil in response to application history. *Planta Daninha*, **33**, 341-349.

Buser H.R. & Müller M.D. (1995). Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environmental Science & Technology*, **29**, 667-672.

Buser H.R., Poiger T. & Müller M.D. (2000). Changed enantiomer composition of metolachlor in surface water following the introduction of the enantiomerically enriched product to the market. *Environmental Science & Technology*, **34**, 2690-2696.

Buser H.R., Muller M.D., Poiger T. & Balmer M.E. (2002). Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: Enantioselective degradation and chiral stability in soil. *Environmental Science & Technology*, **36**, 221-226.

Businelli D. (1997). Pig slurry amendment and herbicide coapplication effects on s-triazine mobility in soil: An adsorption-desorption study. *Journal of Environmental Quality*, **26**, 102-108.

Cabrera A., Cox L., Fernández-Hernández A., García-Ortiz Civantos C. & Cornejo J. (2009). Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **132**, 260-266.

Cadahía López C. (2005). *Fertirrigación: Cultivos Hortícolas, Frutales y Ornamentales*. Ediciones Mundi-Prensa, España.

Calvet R. (1989). Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*, **83**, 145-177.

Camacho-Muñoz D., Martín J., Santos J.L., Aparicio I. & Alonso E. (2009). An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. *Journal of Separation Science*, **32**, 3064-3073.

Cantwell J.R., Liebl R.A. & Slife F.W. (1989). Biodegradation characteristics of imazaquín and imazethapyr. *Weed Science*, **37**, 815-819.

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A. & Cristinzio G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 393-398.

Carabias Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Fernández-Laespada M.E., Calvo-Seronero L. & Sánchez-San Román F.J. (2003). Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Research*, **37**, 928-938.

Cardoso L.P., Tronto J., Crepaldi E.L. & Valim J.B. (2003). Removal of benzoate anions from aqueous solution using Mg-Al layered double hydroxides. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **390**, 49-56.

Cardoso L. & Valim J.B. (2006). Study of acids herbicides removal by calcined Mg-Al-CO₃-LDH. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **67**, 987-993.

Cardoso L.P., Celis R., Cornejo J. & Valim J.B. (2006). Layered double hydroxides as supports for the slow release of acid herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5968-5975.

Carrizosa M.J., Calderón M.J., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2000). Organosmectites as sorbent and carrier of the herbicide bentazone. *Science of the Total Environment*, **247**, 285-293.

Carrizosa M.J., Koskinen W.C., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2001). Dicamba adsorption-desorption on organoclays. *Applied Clay Science*, **18**, 223-231.

Cavani F., Trifiró F. & Vaccari A. (1991). Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catalysis Today*, **11**, 173-301.

Celis R., Barriuso E. & Houot S. (1998a). Sorption and desorption of atrazine by sludge-amended soil: dissolved organic matter effects. *Journal of Environmental Quality*, **27**, 1348-1356.

Celis R., Barriuso E. & Houot S. (1998b). Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere*, **37**, 1091-1107.

Celis R., Koskinen W.C., Cecchi A.M., Bresnahan M.J., Carrizosa M.J., Ulibarri M.A., Pavlovic I. & Hermosín M.C. (1999a). Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **34**, 929-941.

Celis R., Hermosín M.C., Cox L. & Cornejo J. (1999b). Sorption of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environmental Science & Technology*, **33**, 1200-1206.

Celis R. & Koskinen W.C. (1999). An isotopic exchange method for the characterization of the irreversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 782-790.

Celis R., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Ulibarri M.A. & Cornejo J. (2000). Triadimefon interactions with organoclays and organohydrotalcites. *Soil Science Society of American Journal*, **64**, 840-847.

Celis R., Hermosín M.C., Carrizosa M.J. & Cornejo J. (2002a). Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2324-2330.

Celis R., Hermosín M.C., Cornejo L., Carrizosa M.J. & Cornejo J. (2002b). Clay-herbicide complexes to retard picloram leaching in soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **82**, 503-517.

Celis R., Trigo C., Facenda G., Hermosín M.C. & Cornejo, J. (2007). Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6650-6658.

Celis R., Adelino M.A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2012). Montmorillonite–chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, **209–210**, 67–76.

Celis R., Gámiz B., Adelino M.A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2013). Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils. *Science of the Total Environment*, **44**, 288-297.

Celis R., Adelino M.A., Gámiz B., Hermosín M.C., Koskinen W.C. & Cornejo J. (2014). Nanohybrids of Mg/Al layered double hydroxide and long-chain (C18) unsaturated fatty acid anions: Structure and sorptive properties. *Applied Clay Science*, **96**, 81-90.

Celis R., Gámiz B., Facenda G. & Hermosín M.C. (2015a). Enantioselective sorption of the chiral fungicide metalaxyl on soil from non-racemic aqueous solutions: Environmental implications. *Journal of Hazardous Materials*, **300**, 581-589.

Celis R., Gámiz B., Adelino M.A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2015b). Effect of formulation and repeated applications on the enantioselectivity of metalaxyl dissipation and leaching in soil. *Pest Management Science*, **71**, 1572-1581.

Cha J.S., Park S.H., Jung S.C., Ryu C., Jeon J.K., Shin M.C. & Park Y.K. (2016). Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, **40**, 1-15.

Chaara D., Pavlovic I., Bruna F., Ulibarri M.A., Draoui K. & Barriga C. (2010). Removal of nitrophenol pesticides from aqueous solutions by layered double hydroxides and their calcined products. *Applied Clay Science*, **50**, 292-298.

Chaara D., Bruna F., Ulibarri M.A., Draoui K., Barriga C. & Pavlovic I. (2011). Organo/layered double hydroxide nanohybrids used to remove non ionic pesticides. *Journal of Hazardous Materials*, **196**, 350-359.

Chen S. & Liu W. (2008). Toxicity of chiral pesticide Rac-metalaxyl and R-metalaxyl to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **81**, 531-534.

Chen S. & Liu W. (2009). Enantioselective degradation of metalaxyl in anaerobic activated sewage sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **82**, 327-331.

Chibwe K. & Jones W. (1989). Intercalation of organic and inorganic anions into layered double hydroxides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **14**, 926-927.

Chun Y., Sheng G.Y. & Boyd S.A. (2003). Sorptive characteristics of tetraalkylammoniumexchanged smectite clays. *Clays and Clay Minerals*, **51**, 415-420.

Chung N. & Alexander M. (1999). Relationship between nanoporosity and other properties of soil. *Soil Science*, **164**, 726-730.

Collins C., Fryer M. & Grosso A. (2006). Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, **40**, 45-52.

Cornejo J., Celis R., Cox L. & Hermosín M.C. (2004). Pesticide-clay interactions and formulations. En: *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications* (F. Wypych y K.G. Satyanarayana, eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 247-266.

Cornejo J., Celis R., Pavlovic I. & Ulibarri M.A. (2008). Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Clay Minerals*, **43**, 155-175.

Costa F.R, Leuteritz A., Wagenknecht U., Jehnichen D., Häußler L. & Heinrich G. (2008). Intercalation of Mg-Al layered double hydroxide by anionic surfactants: preparation and characterization. *Applied Clay Science*, **38**, 153-164.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (1994). Leaching patterns of pesticides as related to sorption and porosity properties of soils. En: *Proceeding of the BCPC Conference on Pests and Diseases*, Vol 3. BCPC, Brighton, U.K., pp. 1325-1330.

Cox L., Hermosín M.C. & Cornejo J. (1995). Adsorption and desorption of the herbicide thiazafluron as a function of soil properties. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **58**, 305-314.

Cox L., Walker A. & Welch J.W. (1996). Evidence for the accelerated degradation of isopropuron in soil. *Pesticide Science*, **48**, 253-260.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Becker A. & Cornejo J. (1997a). Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **65**, 151-161.

Cox L., Hermosín M.C., Celis R. & Cornejo J. (1997b). Sorption of two polar herbicides in soils and soil clays suspensions. *Water Research*, **31**, 1309-1316.

Cox L., Koskinen W.C. & Yen P.Y. (1998). Changes in sorption of imidacloprid with incubation time. *Soil Science Society of America Journal*, **62**, 342-347.

Cox L. & Walker A. (1999). Studies of time-dependent sorption of linuron and isoproturon in soils. *Chemosphere*, **38**, 2707-2718.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2000a). Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 93-99.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J., Zsolnay A. & Zeller K. (2000b). Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, **34**, 4600-4605.

Cox L., Cecchi A., Celis R., Hermosín M.C., Koskinen W.C. & Cornejo J. (2001). Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Science Society of America Journal*, **65**, 1688-1695.

Cox L., Fernandes M.C., Zsolnay A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2004). Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5635-5642.

Crepaldi E.L., Tronto J., Cardoso L.P. & Valim J.B. (2002). Sorption of terephthalate anions by calcined and uncalcined hydrotalcite-like compounds. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **211**, 103-114.

Crump A. (1998). The A to Z of world development. New Internationalist Publication Ltd., Oxford, UK.

Cruz-Guzmán M., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2004). Adsorption of the herbicide simazine by montmorillonite modified with natural organic cations. *Environmental Science & Technology*, **38**, 180-186.

Cruz-Guzmán M., Celis R., Hermosín M.C., Koskinen W.C. & Cornejo J. (2005). Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7502-7511.

Darder M., Colilla M. & Ruiz-Hitzky E. (2003). Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, **15**, 3774-3780.

Del Hoyo C. (2007). Layered double hydroxides and human health: An overview. *Applied Clay Science*, **36**, 103-121

Donato R.K., Luza L., da Silva R.F., Moro C.C., Guzatto R., Samios D., Mateja L., Dimzoski B., Amico S.C. & Schrekker H.S. (2012). The roles of oleate-functionalized layered double hydroxide in the melt compounding of polypropylene nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C*, **32**, 2396-2403.

DOUE (2009). Reglamento (CE) 1170/2009 de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial de la Unión Europea de 24 de noviembre de 2009, L 309, 1-50. <http://www.boe.es/doue/2009/309/L00001-00050.pdf>

EPA (2000). Interim policy for evaluation of stereoisomeric pesticides. United States Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/interim-policy-evaluation-stereoisomeric-pesticides>

EU Pesticide Database 2017. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=ES>

Evenson R.E & Gollin D. (2003). Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science*, **300**, 758-762.

Ezzaim A., Turpault M.P. & Ranger J. (1999). Quantification of weathering processes in an acid brown soil developed from tuff (Beaujolais, France). Part II. Soil formation. *Geoderma*, **87**, 155-177.

Fageria N.K. (2002). Soil quality vs. environmentally-based agricultural management practises. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **33**, 2301-2329.

Fang H., Tang F.F., Zhou W., Cao Z.Y., Wang D.D., Liu K.L., Wu X.W. & Yu Y.L. (2012). Persistence of repeated triadimefon application and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **47**, 104-110.

FAO (2002). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.

FAO (2015). Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.

Fenoll J., Garrido I., Hellín, P., Flores P., Vela N. & Navarro S. (2015). Use of different organic wastes as strategy to mitigate the leaching potential of phenylurea

herbicides through the soil. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 4336-4349.

Fernandes M.C., Cox L., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2003). Adsorption-desorption of metalaxyl as affecting dissipation and leaching in soils: role of mineral and organic components. *Pest Management Science*, **59**, 545-552.

Fernandes M.C., Cox L., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2006). Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Management Science*, **62**, 1207-1215.

Fernández-Pérez M., González-Pradas E., Ureña-Amate M.D., Wilkins R.M. & Lindrup I. (1998). Controlled release of imidacloprid from a lignin matrix. Water release kinetics and soil mobility study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3828-3834.

Ferreira J.A., Martin-Neto L., Vaz C.M.P. & Regitano J.B. (2002). Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian Oxisol. *Journal of Environmental Quality*, **31**, 1665-1670.

Fogg P., Boxall A.B.A., Walker A. & Jukes A.A. (2003). Pesticide degradation in a "biobed" composting substrate. *Pest Management Science*, **59**, 527-537.

Gámiz B., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2010). Organoclays as soil amendments to increase the efficacy and reduce the environmental impact of the herbicide fluometuron in agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 7893-7901.

Gámiz B., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2013). Effect of olive-mill waste addition to agricultural soil on the enantioselective behavior of the chiral fungicide metalaxyl. *Journal of Environmental Management*, **128**, 92-99.

Gámiz B., Hermosín M.C., Cornejo J. & Celis R. (2015). Hexadimethrine-montmorillonite nanocomposite: Characterization and application as a pesticide adsorbent. *Applied Surface Science*, **332**, 606-613.

Gámiz B., Pignatello J.J., Cox L., Hermosín M.C. & Celis R. (2016a). Environmental fate of the fungicide metalaxyl in soil amended with composted olive-mill waste and its biochar: An enantioselective study. *Science of the Total Environment*, **541**, 779-783.

Gámiz B., Facenda G. & Celis R. (2016b). Evidence for the effect of sorption enantioselectivity on the availability of chiral pesticide enantiomers in soil. *Environmental Pollution*, **213**, 966-973.

Ganigar R., Rytwo G., Gonen Y., Radian A. & Mishael Y.G.. (2010). Polymer-clay nanocomposites for the removal of trichlorophenol and trinitrophenol from water. *Applied Clay Science*, **49**, 311-316.

García-Jaramillo M., Cox L., Cornejo J. & Hermosín M.C. (2014) Effect of soil amendments on the behavior of bentazone and tricyclazole. *Science of the Total Environment*, **466-467**, 906-913.

Garrido T., Fraile J., Ninerola J.M., Figueras M., Ginebreda A. & Olivella L. (2000). Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia (Spain). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **78**, 51-65.

Garrison A.W. (2006). Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. *Environmental Science & Technology*, **40**, 16-23.

Garrison A.W. (2011). An introduction to pesticide chirality and the consequences of stereoselectivity. En: *Chiral Pesticides: Stereoselectivity and Its Consequences*, (Garrison A. et al., eds). ACS Symposium Series, American Chemistry Society, Washington, DC, pp. 1-7.

Gee G.W. & Bauder J.W. (1982). Particle size analysis. en: *Methods of Soil Analysis, Part 1* (A. Klute, ed). American Society of Agronomy Madison, WI., pp. 383-412.

Gennari M., Nègre M. & Vindrola D. (1998). Adsorption of the herbicides imazapyr, imazethapyr and imazaquin on soils and humic acids. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **33**, 547-567.

Gerstl, Z., Nasser A. & Mingelgrin U. (1998). Controlled release of pesticides in soils from clay-polymer formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3797-3802.

Giles C.H., MacEwan T.H., Nakhwa S.N. & Smith D. (1960). Studies in adsorption. Part XII. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society*, **3**, 3973-3993.

Gillman G.P. (2010). Charged clays: An environmental solution. *Applied Clay Science*, **53**, 361-365.

Gish T.J., Schoppet M.J., Helling C.S., Schirmohammadi A., Schnecher M.M. & Wing R.E. (1991). Transport comparison of technical grade and starch-encapsulated atrazine. *Transactions of the ASAE*, **34**, 1738-1744.

González M., Mingorance, M.D., Sánchez L. & Peña A. (2008). Pesticide adsorption on a calcareous soil modified with sewage sludge and quaternary alkyl-ammonium cationic surfactants. *Environmental Science and Pollution Research*, **15**, 8-14.

Gray K.R., Sherman K. & Biddlest A.J. (1971). Review of composting.1. *Process Biochemistry*, **6**, 32-36.

Gu B., Schmitt J., Chen Z., Liang L. & McCarthy J.F. (1994). Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: Mechanisms and models. *Environmental Science & Technology*, **28**, 38-46.

Guggenheim S. & Martin R.T. (1995). Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA and CMS nomenclature committees. *Clay Minerals*, **30**, 257-259.

Hall A. (2012). Sorption and Enantiomerization of Current Use Chiral Pesticides, All Dissertations, Paper 1046. Clemson University TigerPrints.

Hance R.J. (1967). The speed of attainment of sorption equilibria in some systems involving herbicides. *Weed Research*, **7**, 29-36.

Harner T., Wiberg K. & Norstrom R. (2000). Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signature in environmental analysis. *Environmental Science & Technology*, **34**, 218-220.

Hegeman W.J.M. & Laane R.W.P.M. (2002). Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **173**, 85-116.

Hermosín M.C. & Pérez-Rodríguez J.L. (1981). Interaction of chlordimeform with clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, **29**, 143-152.

Hermosín, M.C. & Cornejo J. (1987). Adsorption and desorption of maleic hydrazide as a function of soil properties. *Soil Science*, **44**, 250-256.

Hermosín M.C. & Cornejo J. (1992). Removing 2,4-D from water by organo-clays. *Chemosphere*, **24**, 1493-1503.

Hermosín M.C., Pavlovic I., Ulibarri M. A. & Cornejo J. (1993). Trichlorophenol adsorption on layered double hydroxide: A potential sorbent. *Journal of Environmental Science and Health-Part A Environmental Science and Engineering*, **28**, 9, 1875-1888.

Hermosín M.C., Pavlovic I., Ulibarri M.A. & Cornejo J. (1996). Hydrotalcite as sorbent for trinitrophenol: sorption capacity and mechanism. *Water Research*, **30**, 1, 171-177.

Hermosín M.C., Rodríguez-Lizana A., Cornejo J. & Ordóñez-Fernández R. (2009). Efecto del uso de agroquímicos en olivar sobre la calidad de las aguas. En: *Sostenibilidad de la Producción de Olivar en Andalucía* (J.A. Gómez-Calero, ed). Junta de Andalucía, Sevilla, pp. 87-108.

Hermosín M.C., Calderón M.J., Real M. & Cornejo J. (2013). Impact of herbicides used in olive groves on waters of the Guadalquivir river basin (southern Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **164**, 229-243.

Hildebrandt A., Guillamón M., Lacorte S., Tauler R. & Barceló D. (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research*, **42**, 3315-3326.

Hingston F.J., Posner A.M. & Quirk J.P. (1972). Anion adsorption by goethite and gibbsite. The role of the proton in determining adsorption envelopes. *Journal of Soil Science*, **23**, 177-192.

Horspool W.N. (1976). Aspects of Organic Photochemistry. Academic Press, Londres.

IMPEL (2003). IMPEL Olive Oil Project Report. European Union Network for the implementation and enforcement of Environmental Law.

Jackson M.L. (1975). Soil Chemical Analysis. 2nd edition. University of Wisconsin, Madison, WI.

Jarman J.L., Jones W.J., Howell L.A. & Garrison A.W. (2005). Application of capillary electrophoresis to study the enantioselective transformation of five chiral pesticides in aerobic soil slurries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6175-6182.

Jaynes W.F. & Boyd S.A. (1991a). Hydrophobicity of siloxane surface in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays and Clay Minerals*, **39**, 428-436.

Jaynes W.F. & Boyd S.A. (1991b). Clay mineral type and organic compound sorption by hexadecyltrimethylammonium-exchanged clays. *Soil Science Society of America Journal*, **55**, 43-48.

Jaynes W.F. & Vance G.F. (1996). BTEX sorption by organoclays: cosorptive enhancement and equivalence of interlayer complexes. *Soil Science Society America Journal*, **60**, 1742-1749.

Jones W.J., Mazur C.R., Kenneke J.F. & Garrison A.W. (2007). Enantioselective microbial transformation of the phenylpyrazole insecticide fipronil in anoxic sediments. *Environmental Science & Technology*, **41**, 8301-8307.

Kalathoor R., Botterweck J., Schäffer A., Schmidt B. & Schwarzbauer J. (2015). Quantitative and enantioselective analyses of non-extractable residues of the fungicide metalaxyl in soils. *Journal of Soils and Sediments*, **15**, 659-670.

Kameda T., Miyano Y., Yoshioka T., Uchida M. & Okuwaki A. (2000). New treatment methods for waste water containing chloride ion using magnesium-aluminum oxide. *Chemistry Letters*, **10**, 1136-1137.

Kang M.J., Rhee S.W., Moon H., Neck V. & Fanghanel T. (1996). Sorption of MO_4^- (M=Tc, Re) on Mg/Al layered double hydroxide by anion exchange. *Radiochimica Acta*, **75**, 169-173.

Karathanasis A.D., Adams A.D.F. & Hajek B.F. (1983). Stability relationships in kaolinite, gibbsite and Al-hydroxy interlayered vermiculite soil system. *Soil Science Society of America Journal*, **3**, 1247-1251.

Karickhoff S.W. (1980). Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments. En: *Contaminants and Sediments, Vol. 2*. (R.A. Baker, ed). Ann Arbor Science Publishers, Mich., pp. 193-205.

Katagi T. (2012). Isomerization of chiral pesticides in the environment. *Journal of Pesticide Science*, **37**, 1-14.

Kells J.J., Rieck C.E., Blevind R.L. & Muir M. (1980). Atrazine dissipation as affected by surface pH and tillage. *Weed Science*, **28**, 101-104.

Khan S.U. (1980). Physicochemical processes affecting pesticides in soil. En: *Pesticides in the Soil Environment* (Wakeman R.J., ed). Elsevier Science Publication, Amsterdam, pp. 29-118.

Khodadad C.L.M., Zimmerman A.R., Green S.J., Uthandi S. & Foster J.S. (2011). Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, **43**, 385-392.

Koskinen W.C. & Harper S.S. (1990). The retention process: mechanisms. En: *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling* (H.H. Cheng, ed). SSSA, Madison, WI., pp. 51-77.

Kovanda F., Kováčsová E. & Koloušek D. (1999). Removal of anions from solution by calcined hydrotalcite and regeneration of used sorbent in repeated calcination-rehydration-anion exchange processes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **64**, 1517-1528.

Lagaly G., Weiss A. & Stuke E. (1977). Effect of double-bonds on biomolecular films in membrane models. *Biochimica et Biophysica Acta*, **470**, 331-341.

Lagaly G. (1982). Layer charge heterogeneity in vermiculites. *Clays and Clay Minerals*, **30**, 215-222.

Lagaly G. (2001). Pesticide–clay interactions and formulations. *Applied Clay Science*, **18**, 205–209.

Lakraimi M., Legrouri A., Barroug A., de Roy A. & Besse J.P. (2000). Preparation of a new stable hybrid material by chloride-2,4-dichlorophenoxyacetate ion exchange into zinc-aluminium-chloride layered double hydroxide. *Journal of Materials Chemistry*, **10**, 1007-1011.

Lao W. & Gan J. (2005). Enantioselective degradation and algal phytotoxicity of imidazolinone herbicides, in Abstracts of the 26th SETAC-NA Annual Meeting. Baltimore, MD, Abstract LAO-457 1117-844033.

Lee J.F., Mortland M.M., Chiou C.T., Kile D.E. & Boyd S.A. (1990). Adsorption of benzene, toluene, and xylene by two tetramethylammonium smectites having different charge densities. *Clays and Clay Minerals*, **38**, 113-120.

Lee S.Y., Cho W.J., Hahn P.S., Lee M., Lee Y.B. & Kim K.J. (2005). Microstructural changes of reference montmorillonites by cationic surfactants. *Applied Clay Science*, **30**, 174-180.

Legrouri A., Badreddine M., Barroug A., De Roy A. & Besse J.P. (1999). Influence of pH on the synthesis of the Zn-Al-nitrate layered double hydroxide and the exchange of nitrate by phosphate ions. *Journal of Materials Science Letters*, **18**, 13, 1077-1079.

Li Z., Zhang Z., Zhang L. & Leng L. (2009). Isomer- and enantioselective degradation and chiral stability of fenpropathrin and fenvalerate in soils. *Chemosphere*, **76**, 509-516.

Linares A., Caba J.M., Ligeró F., De la Rubia T. & Martínez J. (2003). Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidio-alba*. *Chemosphere*, **51**, 887–891.

Liu W. & Lee C. (2007). The role of organic matter in the sorption capacity of marine sediments. *Marine Chemistry*, **105**, 240-257.

Liu W., Ye J. & Jin M. (2009). Enantioselective phytoeffects of chiral pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2087-2095.

Loux M.M., Rex A.L. & Slife F.W. (1989). Availability and persistence of imazaquin, imazethapyr and clomazone in soil. *Weed Science*, **37**, 259-267.

Magrans J.O., Alonso-Prados J.L. & García-Baudín J.M. (2002). Importance of considering pesticide stereoisomerism-proposal of a scheme to apply Directive 91/414/EEC framework to pesticide active substances manufactured as isomeric mixtures. *Chemosphere*, **49**, 461-469.

Mansour M., Feicht E. & Meulier P. (1989). Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **20-21**, 139-147.

MAPAMA (2006). Perfil Ambiental de España 2006: Informe Basado en Indicadores. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente. http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/informacion-ambiental-indicadores-ambientales/perfilamb2006_agricultura_tcm7-2076.pdf

MAPAMA (2009). Guía práctica de la Fertilización Racional de los Cultivos en España, Parte I. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente. http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/01_FERTILIZACION%20RACIONAL%20PARTE%20I%20CULTIVOS%20EN%20ESPAÑA%20PARTE%20I%20MINISTERIO%20DE%20AGRICULTURA%20Y%20PESCA%20ALIMENTACIÓN%20Y%20MEDIOAMBIENTE%202009.pdf

MAPAMA (2015). Perfil Ambiental de España 2015: Informe Basado en Indicadores. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente. http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/perfil_ambiental_2015_reducido_tcm7-443427.pdf

MAPAMA (2017). Registro de Productos Fitosanitarios. <http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/22193.pdf>

Marín-Benito J.M., Sánchez-Martín M.J., Andrades S.M., Perez-Clavijo M. & Rodríguez-Cruz M.S. (2009). Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides: 1. Adsorption-desorption of penconazole

and metalaxyl by soils and subsoils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 9634-9642.

Martín S.M., Kookana R.S., Van Zwieten L. & Krull E. (2012). Marked changes in herbicide sorption-desorption upon ageing of biochars in soil. *Journal of Hazardous Materials*, **231-232**, 70-78.

Martinazzo R., Jablonowski N.D., Hamacher G., Dick D.P. & Buraue P. (2010). Accelerated degradation of ^{14}C -Atrazine in Brazilian soils from different regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 7864-7870.

Marucchini C. & Zadra C. (2002). Stereoselective degradation of metalaxyl and metalaxyl-M in soil and sunflower plants. *Chirality*, **14**, 32-38.

Matallo M., Romero E., Sánchez-Rasero F., Peña A. & Dios G. (1998). Adsorption of mecoprop and dichlorprop on calcareous and organic matter amended soils: comparative adsorption of racemic and pure enantiomeric forms. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **33**, 31-66.

Melero S., Madejón E., Ruiz J.C. & Herencia J.F. (2007). Chemical and biochemical properties of a clay soil under dryland agriculture system as affected by organic fertilization. *European Journal of Agronomy*, **26**, 327-334.

Meng J., Zhang H., Evans D.G., Duan X. (2005). Novel layered pesticide slow/controlled release materials-Supramolecular structure and slow release property of glyphosate intercalated layered double hydroxides. *Chinese Science Bulletin*, **50**, 745-751.

Miyata S. (1980) Physicochemical properties of synthetic hydrotalcites in relation to composition. *Clays and Clay Minerals*, **28**, 50-56.

Miyata S. (1983) Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays and Clay Minerals*, **31**, 305-311.

Monkiedje A., Olusoji M. & Spiteller M. (2002). Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 1939-1948.

Monkiedje A. & Spiteller M. (2002). Sorptive behavior of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. *Chemosphere*, **49**, 659-668

Morrison S.J. & Spangler R.R. (1993). Chemical barriers for controlling groundwater contamination. *Environmental Progress*, **12**, 175-181.

Motogana K., Takagi K. & Matumoto S. (1998). Suppression of chlorothalonil degradation in soil after repeated application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 1469-1472.

Müller M.D. & Buser H. (1995). Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 2. Stereo- and enantioselective degradation in sewage sludge and soil. *Environmental Science & Technology*, **29**, 2031-2037.

Müller M.D. & Buser H. (1997). Conversion reactions of various phenoxyalkanoic acid herbicides in soil. 1. Enantiomerization and enantioselective degradation of the chiral 2-phenoxypropionic acid herbicides. *Environmental Science & Technology*, **31**, 1953-1959.

Nelson R.E. (1982). Carbonate and gypsum. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition* (Page A.L., Miller R.H. & Keeney D.R., eds). American Society of Agronomy and Soil Science of American, Madison, WI, pp. 181-197.

Nelson D.V. & Sommers L.E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition* (Page A.L., Miller R.H. & Keeney D.R., eds). American Society of Agronomy and Soil Science of American, Madison, W.I., pp. 539-577.

Nye J.V., Guerin W.F. & Boyd S.A. (1994). Heterotrophic activity of microorganisms in soils treated with quaternary ammonium compounds. *Environmental Science & Technology*, **28**, 944-951.

O'Connor G.A., Wierenga P.J., Cheng H.H. & Doxtader K.G. (1980). Movement of 2,4,5-T through large soil columns. *Soil Science*, **130**, 157-162.

Oravec M., Simek Z. & Holoubek I. (2010). The effect of humic acid and ash on enantiomeric fraction change of chiral pollutants. *Colloids and Surfaces*, **359**, 60-65.

Orthman J., Zhu H.Y. & Lu G.Q. (2003). Use of anion clay hydrotalcite to remove coloured organics from aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*, **31**, 1, 53-59.

Park Y., Sun Z., Ayoko G.A. & Frost R.L. (2014). Removal of herbicide from aqueous solution by modified form of montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science*, **415**, 127-132.

Pavlovic I., Ulibarri M.A., Hermosín M.C. & Cornejo J. (1997). Sorption of an anionic surfactant from water by a calcined hydrotalcite-like sorbent. *Fresenius Environmental Bulletin*, **6**, 5-6, 266-271.

Pavlovic I., Barriga C., Hermosín M.C., Cornejo J. & Ulibarri M.A. (2005). Adsorption of acidic pesticides 2,4 D, clopyralid and picloram on calcined hydrotalcite. *Applied Clay Science*, **30**, 125-133.

Pérez-Ruzafa A., Navarro S., Barba A., Marcos C., Cámara M.A., Salas F. & Gutiérrez J.M. (2000). Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 140-151.

Picó Y., Molto J.C., Redondo M.J., Viana F., Manes J. & Font G. (1994). Monitoring of the pesticide levels in natural waters of the Valencia community (Spain). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**, 230-237.

Potter T.L., Strickland T.C., Joo H. & Culbreath A.K. (2005). Accelerated soil dissipation of tebuconazole following multiple applications to peanut. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 1205-1213.

Qian H., Hu H., Mao Y., Ma J., Zhang A., Liu W. & Fu Z. (2009). Enantioselective phytotoxicity of the herbicide imazethapyr in rice. *Chemosphere*, **76**, 885-892.

Qin S. & Gan J. (2007). Abiotic enantiomerization of permethrin and cypermethrin: effects of organic solvents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5734-5739.

Qin F., Gao Y.X., Guo B.Y., Xu P., Li J.Z. & Wang H.L. (2014). Environmental behavior of benalaxyl and furalaxyl enantiomers in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **49**, 738-746.

Qiu D., Li Y., Fu X., Jiang Z., Zhao X., Wang T. & Hou W. (2009). Controlled-release of avermectin from organically modified hydrotalcite-like compound nanohybrids. *Chinese Journal of Chemistry*, **27**, 445-451.

Ramezani M.K., Oliver D.P., Kookana R.S., Gill G. & Preston C. (2008). Abiotic degradation (photodegradation and hydrolysis) of imidazolinone herbicides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **43**, 105-112.

Ramezani M.K., Oliver D.P., Kookana R.S., Lao W., Gill G. & Preston C. (2010). Faster degradation of herbicidally-active enantiomer of imidazolinones in soils. *Chemosphere*, **79**, 1040-1045.

Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jiménez B. & Garcia-Pareja M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **38**, 283-290.

Regitano J.B., Bischoff M., Lee L.S., Reichert J.M. & Turco R.F. (1997). Retention of imazaquín in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 397-404.

Reichle W.T. (1986). Synthesis of anionic clay-minerals (mixed metal-hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ionics*, **22**, 135-141.

Rocha W.S.D., Regitano J.B., Alleoni L.R.F. & Tornisiello V.L. (2002). Sorption of imazaquín in soils with positive balance of charges. *Chemosphere*, **49**, 263-270.

Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J., Andrades M.S. & Sánchez-Camazano M. (2007). Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. *Journal Hazardous Materials*, **139**, 363-372.

Roig A., Cayuela M.L. & Sánchez-Monedero, M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, **26**, 960-969.

Romero E., Matallo M.B., Peña A., Sánchez-Rasero F., Schmitt-Kopplin Ph. & Dios G. (2001). Dissipation of racemic mecoprop and dichlorprop and their pure R-enantiomers in three calcareous soils with and without peat addition. *Environmental Pollution*, **111**, 209-215.

Sánchez L., Romero E., Sánchez-Rasero F.S., Dios G. & Peña A. (2003). Enhanced soil sorption of methidathion using sewage sludge and surfactants. *Pest Management Science*, **59**, 857-864.

Sánchez-Camazano M., Sánchez-Martín M.J. & Crisanto T. (1995). Occurrence of atrazine in surface and ground waters in the province of Salamanca (Spain). *Toxicological and Environmental Chemistry*, **47**, 203-208.

Sander M., Lu Y. & Pignatello J.J. (2005). A thermodynamic based method to quantify true sorption hysteresis. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 1063-1072.

Sarkar B., Megharaj M., Xi Y., Krishnamurti G.S.R. & Naidu R. (2010). Sorption of quaternary ammonium compounds in soils: Implications to the soil microbial activities. *Journal of Hazardous Materials*, **184**, 448-456.

Sato T., Wakabayashi T., Shimada M. (1986). Adsorption of various anions by magnesium aluminum oxides ($\text{Mg}_{0.7}\text{Al}_{0.3}\text{O}_{1.15}$). *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, **25**, 89-92.

Sato T. & Okuwaki A. (1991). Intercalation of benzenecarboxylate ions into the interlayer of hydrotalcite. *Solid State Ionics*, **45**, 43-48.

Sekhon B.S. (2009). Chiral Pesticides. *Journal of Pesticide Science*, **34**, 1-12.

Shaner D.L., Brunk G., Belles D., Westra P. & Nissen S. (2006). Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science*, **62**, 617-623.

Shen Y.H. (2004). Phenol sorption by organoclays having different charge characteristics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **232**, 143-149.

Sheng G.Y. & Boyd S.A. (2000). Polarity effect on dichlorobenzene sorption by hexadecyltrimethylammonium-exchanged clays. *Clays and Clay Minerals*, **48**, 43-50.

Shin H.S., Kim M.J., Nam S.Y. & Moon H.C. (1996). Phosphorus removal by hydrotalcite-like compounds (HTLcs). *Water Science & Technology*, **34**, 161-168.

Si Y.B., Zhang J., Wang S.Q., Zhang L.G. & Zhou D.M. (2006). Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuronmethyl in acidic soils in China. *Geoderma*, **130**, 66-67.

Si Y., Wang M., Tian C., Zhou J. & Zhou D. (2011). Effect of charcoal amendment on adsorption, leaching and degradation of isoproturon in soils. *Journal of Contaminant Hydrology*, **123**, 75-81.

Schmidt R.R. & Fedtke C. (1977). Metamitron activity in tolerant and susceptible plants. *Pesticide Science*, **8**, 611-617.

Stougaard R.N., Shea P.J. & Martin A.R. (1990). Effect of soil type and pH on adsorption, mobility, and efficacy of imazaquin and imazethapyr. *Weed Science*, **38**, 67-73.

Sukul P. & Spiteller M. (2001). Persistence, fate, and metabolism of [^{14}C]Metalaxyl in typical Indian soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2352-2358.

Sukul P., Lamshöft M., Zühlke S. & Spiteller M. (2013). Evaluation of sorption-desorption process for metalaxyl in natural and artificial soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **48**, 431-441.

Tan H., Cao Y., Tang T., Qian K., Chen W.L. & Li J. (2008). Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils. *Science of the Total Environment*, **407**, 428-437.

Tang J., Zhu W., Kookana R. & Katayana A. (2013). Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **116**, 653-639.

Tanner M.E. (2002). Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization. *Accounts of Chemical Research*, **35**, 237-246.

Tecle B., Da Cunha A. & Shaner D. L. (1993). Differential routes of metabolism of imidazolinones: Basis for soybean (*Glycine max*) selectivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **46**, 120-130.

Terry R.R. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Tester C.F. (1990). Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. *Soil Science Society of America Journal*, **54**, 827-831.

Tomlin C.D.S. (2006). *The Pesticide Manual*, fourteenth Ed. British Crop Protection Council, Hampshire, UK.

Toraishi T., Nagasaki S. & Tanaka S. (2002). Adsorption behavior of IO_3^- by CO_3^{2-} and NO_3^- -hydrotalcite. *Applied Clay Science*, **22**, 17-23.

Trigo C., Celis R., Hermosín M.C. & Cornejo J. (2009). Organoclay-based formulations to reduce the environmental impact of the herbicide diuron in olive groves. *Soil Science Society of America Journal*, **73**, 1652–1657.

Trigo C., Spokas K.A., Cox L., Koskinen C. (2014). Influence of soil biochar aging on sorption of the herbicide MCPA, nicosulfuron, terbuthylazine, indaziflam, and fluoroethyldiaminotriazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 10855–10860.

Ulibarri M.A., Pavlovic I., Hermosín M.C. & Cornejo J. (1995). Hydrotalcite-like compounds as potential sorbents of phenols from water. *Applied Clay Science*, **10**, 131-145.

Undabeytia T., Nir S. & Rubin B. (2000). Organo-clay formulations of the hydrophobic herbicide norflurazon yield reduced leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4767-4773.

Undabeytia T., Mishaël Y.G., Nir S., Papahadjopoulos-Sternberg B., Rubin B., Morillo E. & Maqueda C. (2003). A novel system for reducing leaching from formulations of anionic herbicides: clay liposomes. *Environmental Science & Technology*, **37**, 4475-4480.

Undabeytia T., Recio E., Maqueda C., Sánchez-Verdejo T. & Balek V. (2012). Slow diuron release formulations based on clay-phosphatidylcholine complexes. *Applied Clay Science*, **55**, 53-61.

Ulrich E.M., Morrison C.N., Goldsmith M.R. & Foreman W.T. (2012). Chiral pesticides: identification, description, and environmental implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **217**, 1-74.

Van der Mensbrugghe D., Osorio-Rodarte I., Burns A. & Baffes J. (2009). Macroeconomic environment, commodity markets: a longer term outlook. Expert Meeting on How to Feed the World in 2050. Economic and Social Development Department. FAO

Voudrias E.A. (2002). The concept of a sorption chemical barrier for improving effectiveness of landfill liners. *Waste Management & Research*, **20**, 251-258.

Wang B., Zhang H., Evans D.G. & Duan X. (2005). Surface modification of layered double hydroxides and incorporation of hydrophobic organic compounds. *Materials Chemistry and Physics*, **92**, 190-196.

Wang X., Jia G., Qiu J., Diao J., Zhu W., Lv C. & Zhou Z. (2007a). Stereoselective degradation of fungicide benalaxyl in soils and cucumber plants. *Chirality*, **19**, 300-306.

Wang H., Li Y., Wei G. & Wang X. (2007b). Imazaquin degradation and metabolism in a sandy loam soil amended with farm litters. *Journal of Environmental Science*, **19**, 1108-1113.

Wang H., Li Y. & Wang X. (2008). Modification to imazaquin degradation in soil amended with farm manure. *Soil & Sediment Contamination*, **17**, 41-52.

Wang C.J., Li Z., Jiang W.T., Jean J.S. & Liu C.C. (2010). Cation exchange interaction between antibiotic ciprofloxacin and montmorillonite. *Journal of Hazardous Materials*, **183**, 309-314.

Wang F., Zhu L., Wang X., Wang J. & Wang J. (2015). Impact of repeated applications of Metalaxyl on its dissipation and microbial community in soil. *Water, Air & Soil Pollution*, **226**, 430.

Washington J.B., Pignatello J.J., Lu Y., Ravikovitch P.I., Neimark A.V. & Xing B. (2003). Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. *Environmental Science & Technology*, **37**, 409-417.

Watson J.R., Posner A.M. & Quirk J.P. (1973). Adsorption of the herbicide 2,4-D on goethite. *Journal of Soil Science*, **24**, 503-511.

Wauchope R.D. (1978). The pesticides content of surface water drainage from agricultural fields – A Review. *Journal of Environmental Quality*, **7**, 459-472.

Wauchope R.D. & Myers R.S. (1985). Adsorption-desorption kinetics of atrazine and linuron in freshwater sediment aqueous slurries. *Journal of Environmental Quality*, **14**, 132-136.

Weber J.B., Swain L.R., Streck H.J. & Sartori J.L. (1980). Herbicide mobility in soil leaching columns. En: *Research Methods in Weed Science* (Camper, N.D., ed.). Southern Weed Science Society, Champaign, IL, pp. 189-200.

Weber J.B., McKinnon E.J. & Swain L.R. (2003). Sorption and mobility of ¹⁴C-labeled imazaquin and metolachlor in four soils as influenced by soil properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 5752-5759.

Wedyan M. & Preston M.R. (2005). Isomer-selective adsorption of amino acids by components of natural sediments. *Environmental Science & Technology*, **39**, 2115-2119.

Wei J., Zhang X., Li X., Zeng D. & Tan H. (2016). Enantioselective phytotoxicity of imazamox against maize seedling. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **96**, 242-247.

WRB (2014). Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IUSS Grupo de Trabajo WRB. Roma.

Xu Z.P., Braterman P.S., Yu K., Xu H., Wang Y. & Brinker C.J. (2004). Unusual hydrocarbon chain packing mode and modification of crystalline growth habit in the self-assembled nanocomposites zinc-aluminum-hydroxide oleate and elaidate (cis- and trans-[Zn₂Al(OH)₆(CH₃(CH₂)/CH=CH₇COO-)] and magnesium analogues. *Chemistry Materials*, **16**, 2750-2756.

Ye J., Zhao M., Liu J. & Liu W. (2010). Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticide. *Environmental Pollution*, **158**, 2371-2383.

Ye J., Zhao M., Niu L., Liu W. (2015). Enantioselective environmental toxicology of chiral pesticides. *Chemical Research in Toxicology*, **28**, 325-338.

You Y., Zhao H. & Vance G.F. (2002). Surfactant-enhanced adsorption of organic compounds by layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **205**, 161-172.

Zadra C., Marucchini C. & Zazzerini A. (2002). Behavior of metalaxyl and its pure *R*-enantiomer in sunflower plants (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5373-5377.

Zhang J., Fu Q., Wang H., Li J., Wang W., Yang Z., Zhang S., Ye Q., Li C. & Li Z. (2013). Enantioselective uptake and translocation of a novel chiral neonicotinoid insecticide cycloxaprid in Youdinger (*Brassica campestris* subsp. *Chinensis*). *Chirality*, **25**, 686-691.

Zhang W., Cheng C., Chen L., Di S., Liu C., Diao J. & Zhou Z. (2016). Enantioselective toxic effects of cyproconazole enantiomers against *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere*, **150**, 50-57.

Zhou Q., Xu C., Zhang Y. & Liu W. (2009). Enantioselectivity in the phytotoxicity of herbicide imazethapyr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1624-1631.

Zipper C., Bunk M., Zenhder A.J.B. & Kohler H.E. (1998). Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide diclorprop [(*RS*)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingomonas herbicidovarans* MH. *Journal of Bacteriology*, **180**, 3368-3374.

Zsolnay A. (2003). Dissolved organic matter: artefacts, definitions and functions. *Geoderma*, **113**, 187-209.

7. PUBLICACIONES



López-Cabeza R., Cornejo J. & Celis R. (2016). Evaluation of an organo-layered double hydroxide and two organic residues as amendments to immobilize metalaxyl enantiomers in soils: A comparative study. *Journal of Environmental Management*, **181**, 135-145.

Gámiz B., **López-Cabeza R.**, Facenda G., Velarde P., Hermosín M.C., Cox L. & Celis R. (2016). Effect of synthetic clay and biochar addition on dissipation and enantioselectivity of tebuconazole and metalaxyl in an agricultural soil: Laboratory and field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **230**, 32-41.

López-Cabeza R., Gámiz B., Cornejo J. & Celis R. (2017). Behavior of the enantiomers of the herbicide imazaquin in agricultural soils under different application regimes. *Geoderma*, **293**, 64-72.